

**Az MDR1 gén kromatin szerkezetének tanulmányozása gyógyszerérzékeny és
gyógyszerrezisztens humán sejtekben**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Tóth Mónika

Témavezető: Dr. Bálint Éva

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány

Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézet

BAYGEN

Szeged

2012

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés.....	6
2.1. Az epigenetika és a transzkripció kapcsolata	6
2.1.1. A kromatin összetétele.....	6
2.1.2. DNS metiláció	6
2.1.3. Poszttranszlációs hiszton módosítások.....	7
2.1.4. A transzkripció epigenetikus szabályozása	8
2.1.5. A hiszton acetiláció szabályozása.....	10
2.1.5.1. Hiszton acetiltranszferázok.....	10
2.1.5.2. Hiszton deacetilázok.....	13
2.1.5.3. HAT és HDAC enzimek szerepe a transzkripcióban aktív és inaktív gének szabályozásában	14
2.1.5.4. A hiszton acetiltranszferázok transzkripciós koaktivátor működését leíró modellek	15
2.1.6. A hiszton acetiláció szerepe a malignus transzformációban	17
2.1.6.1. HAT enzimek szerepe a karcinogenezisben.....	18
2.1.6.2. HDAC enzimek szerepe a karcinogenezisben.....	19
2.1.6.3. A tumorsejtek megváltozott epigenetikai szabályozásának következményei a genom szintjén.....	20
2.1.7. HAT és HDAC gátlószerek	23
2.2. A többszörös gyógyszerrezisztencia jelensége	24
2.2.1. ABC-transzporterek.....	24
2.2.2. Magas PgP-szint a kemoterápiás kezelés alatt	25
2.2.3. Az MDR1 gén transzkripciós és poszttranszkripciós szabályozása	26
2.2.4. Az MDR1 gén epigenetikai szabályozása	29
2.2.5. A multidrog rezisztencia kezelési lehetőségei.....	32
2.2.6. A HDAC gátlás hatása az MDR1 gén expressziójára	33
3. Célkitűzések	35
4. Felhasznált anyagok és módszerek	36

5. Eredmények.....	45
5.1 Az MDR1/ABCB1 vagy MRP1/ABCC1 gének megnövekedett kifejeződésének illetve a gének amplifikációjának lehetséges szerepe a doxorubicin rezisztenciában	45
5.2 A megnövekedett génműködéshez epigenetikai változások járulhatnak hozzá	49
5.3 Hiszton deacetiláz gátlás génexpresszióra és a hiszton acetiláltságra kifejtett.....	54
hatása eltérő a vizsgált sejtvonalakban.	54
5.4 A HDAC gének kifejeződésének szerepe a drogrezisztens sejtek megváltozott hiszton acetilációs szintjének szabályozásában.	59
5.5 PCAF és GCN5 hiszton acetiltranszferázok gátlásának génexpresszióra kifejtett hatása eltérő a vizsgált sejtvonalakban.	60
5.6 p300 hiszton acetiltranszferáz gátlásának génexpresszióra és a hiszton acetiláltságra kifejtett hatása eltérő a vizsgált sejtvonalakban.....	64
6. Diskusszió.....	71
7. Irodalomjegyzék.....	85
8. Köszönetnyilvánítás	92
9. Összefoglaló.....	93
10. Summary	100

1. Rövidítések jegyzéke

3' UTR: 3' untranslated region
ABC: ATP binding cassette
ADA2B: transcriptional adaptor 2B
AP-1: transcription factor AP-1
APE-1: apurinic/aprimidinic endonuclease 1
ATAC: Ada-Two-A containing
CBP: cAMP response element binding protein
cFOS: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
ChIP: chromatin immunoprecipitation
Ct: threshold cycle
EGR-1: early growth response protein 1
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCN5: general control nonderepressible 5
GNAT: GCN5-related N-acetyltransferases
HAT: histone acetyltransferase
HATi II: histone acetyltransferase inhibitor II
HDAC: histone deacetylase
HDACi: histone deacetylase inhibitor
KAT: K(lysine) acetyltransferase
MCF7: humán emlőkarcinóma sejtvonal
MDR1: multidrug resistance 1
MEF1: MDR1 promoter-enhancing factor 1
MLL: myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
MRP1: multidrug resistance associated protein 1
MTT: thiazolyl blue tetrazolium bromide
MYST: MOZ/Ybf2/Sas3, Sas2 and Tip60
NF-Y: nuclear transcription factor Y
NF-κB: nuclear factor kappa beta
p300: E1A binding protein p300
p53: tumor protein p53
PCAF: p300/CBP associated factor
PgP: P-glycoprotein
PHD: plant homeodomain
Pol II: RNA polymerase II
QPCR: quantitative PCR
RPIB9: Rap2 interacting protein 9
RT-QPCR: reverse transcription- quantitative PCR
SAGA: Spt-Ada-GCN5 containing acetyltransferase
siRNS: kis gátló (small inhibitory/ interfering) RNS

SIRT silent mating type information regulation 2, *S.cerevisiae*, homolog

TSA: trichostatin A

U2OS: human osteosarcoma cell line

UPS: upstream promoter

WTH3: RAB6C, member RAS oncogene family gene alternative name

YB-1: Y box binding protein 1

Y-box: inverted CCAAT promoter element

2. Bevezetés

2.1. Az epigenetika és a transzkripció kapcsolata

2.1.1. A kromatin összetétele

A kromatin olyan dinamikus makromolekuláris komplex, amelyet DNS, hiszton és nem-hiszton fehérjék, valamint RNS építenek fel (Johnstone 2002; Nagy and Tora 2007). Ismétlődő alapegysége a nukleoszóma, amelyet két H2A-H2B hisztonokból álló dimer és a H3-H4 hisztonok tetramerje alkot. A nukleoszóma köré 146 bp-os DNS darab tekeredik fel. A nukleoszóma közötti variábilis méretű linker DNS szakaszokat, melyek átlagos hosszúsága 35 bp, elektrosztatikusan a H1 hiszton semlegesíti, ezzel hozzájárul a magasabb rendű kromatin struktúrák kialakulásához. (Woodcock and Ghosh 2010)

A kromatin epigenetikai módosításai olyan szerkezeti változások, amelyek a megváltozott génműködést rögzíthetik és a sejtosztódás során örökíthetik, anélkül, hogy a DNS szekvenciája megváltozna (Bird 2007). Az epigenetikai információ többek között a citozin bázisok és a kromatint felépítő hiszton fehérjék kémiai módosításaiként tárolódik (Bernstein, Meissner et al. 2007). Ezek a kémiai változások módosítják a kromatin szerkezetét, így a DNS-hez való hozzáférést befolyásolják. Emellett a kromatin szerkezet megváltozik a nem-kódoló RNS-ek kromatinhoz kapcsolódása, hiszton variánsok nukleoszómaiba építése, valamint nukleoszóma ATP függő kromatin átrendező (remodelling) komplexek segítségével történő elmozdítása révén is (Racki and Narlikar 2008; Zhou, Hu et al. 2008; Loyola and Almouzni 2007).

2.1.2 DNS metiláció

Eukarióta sejtekben a DNS metiláció központi szerepet játszik a génrepresszió és a genom szerveződésének, stabilitásának szabályozásában (Kapoor, Agius et al. 2005). Gerincesekben a DNS metilálódása szinte kizárólag a CpG dinukleotidok citozin bázisának C5-os pozícióban lévő szénatomján történik (Bernstein, Meissner et al. 2007). A magas (G+C) arányú és CpG dinukleotid tartalmú úgynevezett CpG-szigetek megtalálhatóak a humán gének 60 %-nak promóter régiójában, illetve jelentős részük repetitív elemeken belül helyezkedik el. A promóterekben található CpG szigetek többnyire nem metiláltak,

míg a repetitív elemekben lévőkre jellemző ez a módosítás. A metilált citozin bázis az alapján vesz részt a génrepresszió, X kromoszóma inaktiváció és számos egyéb folyamat szabályozásában, hogy elősegíti vagy gátolja specifikus szabályozó fehérjék kikötődését. A metiláció kialakításáért és fenntartásáért felelős metiltranszferázok jól ismertek. A sejtosztódás során öröklődik a kialakult DNS metilációs mintázat, melynek alapja a hemimetilált CpG dinukleotidokra specifikus Dnmt1 metiltranszferáz. A sejt differenciálódás során jól szabályozott, aktív demetiláció figyelhető meg, amely együtt jár aktív génátírással jellemző hiszton módosítások megjelenésével (Klug, Heinz et al. 2010), ugyanakkor aktív DNS demetilációt DNS bázis excíziós repair mechanizmussal végző enzimeket csak nemrégiben írtak le növényi (Kapoor, Agius et al. 2005) és emlős sejtekben (Hajkova, Jeffries et al. 2010).

2.1.3 Poszttranszlációs hiszton módosítások

A globuláris hiszton fehérjék poszttranszlációs módosításainak legnagyobb része a fehérjék igen konzervált, strukturálatlan N-terminális régiójában történik, melyet faroknak is neveznek. A H2A, H2B, H3 és H4 hisztonok túlnyúló farki régiójának több mint hatvan különböző aminosav oldalláncán jöhet létre a következő kilenc ismert poszttranszlációs módosítás: acetiláció, metiláció, foszforiláció, ubikvitináció, szumoiláció, ADP-riboziláció, deimináció, prolin izomerizáció és biotinináció (Filenko, Kolar et al.; Kouzarides 2007). Ezek a poszttranszlációs módosítások nemcsak a genom eukromatin és heterokromatin egységekre tagolásához járulnak hozzá, hanem szerepet játszanak a DNS alapú folyamatok, így a transzkripció, a DNS-javítás, a replikáció szabályozásában is (Kouzarides 2007). Ezen lokális vagy genomi szintű műveletek során egyaránt szükséges a DNS kicsomagolódása, majd az azzal való manipuláció után a helyes kromatinstruktúra visszaállítása.

A hiszton módosítások dinamikus rendszerében az acetiláció, metiláció, foszforiláció és a deimináció adott stimulusra percekben belül megjelenhet a kromatinban. Ezek reverzibilitását specifikus enzimek biztosítják (Shi and Whetstine 2007; Kouzarides 2007). A hiszton módosítások egy része öröklődik a sejtosztódások során (Bernstein, Meissner et al. 2007). A testvérkromatidák között random módon szegregálnak a különféle módosításokat hordozó hiszton fehérjék, majd az örökölt hisztonok irányítják az újonnan

szintetizált hisztonok eredetivel megegyező modifikációs állapotának létrejöttét. Ennek alapja, hogy a hiszton módosításokat katalizáló enzimkomplexek a specifikus módosítást létrehozni és kötni is képesek. Azok a hiszton módosítások, amelyek kiterjedt genomi régiókra (ún. kromatin domének) jellemzőek, kisebb valószínűséggel vesznek el a sejtosztódás során. Ez lehet az alapja annak az epigenetikus memóriának, amely megőrzi a sejt differenciálódás során kritikus (lineage specific) gének represszióját vagy fenntartja expressziójukat.

A poszttranszlációs módosítások hatásukat két fő mechanizmus révén fejthetik ki. Egyrészt megváltoztatják a szomszédos nukleosómák közötti hiszton kapcsolatokat illetve a hiszton-DNS kapcsolatot, ezzel módosítják a kromatin szerkezetét. A legismertebb ilyen irányú változás a hiszton acetiláció, amely fellazítja a kromatint azáltal, hogy semlegesíti a hiszton fehérjék N-terminálisán lévő bázikus lizin aminosavakat. Másrészt a hiszton módosítások elősegíthetik vagy gátolhatják a transzkripció szabályozásában résztvevő fehérjék kromatinhoz kötődését, melyek enzimaktivitásuk révén további kromatin módosításokat katalizálhatnak. A fehérjék a módosított hiszton oldalláncokhoz specifikus domének segítségével kötődnek, így az acetil lizint a bromodomén, a metil lizint a chromo- és a PHD domének, a foszforilációt a 14-3-3 fehérjék doménjai ismerik fel. A hiszton kód hipotézis szerint az egyes hiszton módosítások kombinációja alakítja ki a további szabályozó faktorok által leolvasott felületet (Strahl and Allis 2000). A hiszton kód mai értelmezése alapján az egyes módosítások meghatározott funkciót töltenek be a DNS-t használó biológiai folyamatokban, amelyet azonban más módosítások befolyásolhatnak. A hipotézist bizonyítva, egyre több kísérletes adat mutatja, hogy specifikus hiszton módosítások kombinációja szükséges a különböző kromatin alapú folyamatok szabályozásához (Schreiber and Bernstein 2002; Kouzarides 2007).

2.1.4. A transzkripció epigenetikus szabályozása

Az eukarióta transzkripció szigorúan szabályozott, soklépéses folyamat; az mRNS-eket kódoló gének átírását végző RNS polimeráz II működéséhez számos transzkripciós aktivátor, koaktivátor és általános transzkripciós faktor szükséges (Nagy and Tora 2007). A transzkripciós koaktivátorok egy része a szekvenciaspecifikus aktivátorokat kapcsolja az általános transzkripciós apparátushoz. Másik csoportjuk, melybe kromatin átrendező és

módosító enzimek tartoznak, a génkifejeződéshez szükséges kromatin szerkezetet alakítja ki.

Általánosan transzkripció koaktivátor szerepe van a hisztonok acetilációs és foszforilációs módosítását katalizáló enzimeknek; a szumoiláció, a deimináció és a prolin izomerizáció represszálo hatású; az ubikvitináció és a metiláció funkciója a módosítás helyének függvénye (Kouzarides 2007; Shi and Whetstine 2007). Részletesen a hisztonok poszttranszlációs metilációja és acetilációja tanulmányozott. A fehérjék lizin aminosavjaihoz kapcsolódhat mono-, di-, vagy trimetil csoport, az arginin lehet monometilált, és szimmetrikusan vagy asszimmetrikusan dimetilált, míg az acetiláció csak lizin aminosavakon történik. Az egyes acetil lizinek mennyisége többnyire pozitívan korrelál a génexpresszióval (Wang, Zang et al. 2008; Jin, Yu et al. 2011), azonban egyes géncsoportok esetében specifikus acetil lizin módosítások mennyisége represszált állapotban emelkedik meg (Zsindely, Pankotai et al. 2009; Gatta and Mantovani). Ismert, hogy egyes acetil lizin módosítások a transzkripció start helyre jellemzőek, míg mások a promóter mellett a gén kódoló régiójában is megtalálhatóak. Amíg a hiszton H3 9- és 27-es, illetve a hiszton H4 20-as pozícióban lévő lizinjeinek (K) di-és/vagy trimetilációja (H3K9me₂, H3K9me₃, H3K27me₂, H4K20me₃) repressziós jel, addig az egyéb metilációs módosítások a génaktivációval korrelálnak (Wang, Zang et al. 2008).

39 acetilációs és metilációs hiszton módosítás genomi szintű eloszlását humán CD4⁺ T-sejtekben vizsgálva azt találták, hogy a promóter és enhancer régiók jellegzetes hiszton módosítási mintázattal rendelkeznek (Wang, Zang et al. 2008). Számos magas expressziós szintű gén promóter kromatinjában jelen van egy 17 hiszton módosításból illetve hiszton variánsból álló modul, azaz a következő módosítások nagy valószínűséggel együttesen fordulnak elő a transzkripció iniciációs régióban: H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me₁, H3K4me₃, H3K9ac, H3K9me₁, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K91ac. Ez a módosítási mintázat megtalálható a humán gének 25%-ának promóterében. Ez a megfigyelés alátámasztja a hiszton kód hipotézist és arra utal, hogy a hiszton módosítások kooperatív együttműködése szükséges a transzkripcióan aktív kromatin kialakításához.

2.1.5 A hiszton acetiláció szabályozása

A kromatin hiszton acetilációs állapotát két, egymással ellentétesen ható enzimescsoport szabályozza (Wang, Zang et al. 2009). A hiszton acetiltranszferáz (HAT) és hiszton deacetiláz (HDAC) enzimek katalizálják az acetil csoportok target lizin aminosavakhoz való kötését, ill. az onnan való hasítását.

2.1.5.1 Hiszton acetiltranszferázok

A hiszton acetiltranszferázok az acetil-koenzim A kofaktor felhasználásával a lizin aminosav ϵ -amino-csoportjához kötik az acetil csoportot. A hiszton acetiltranszferáz enzimeket öt családba sorolták (Nagy and Tora 2007; Nagy, Riss et al. 2010), melyek közül a részletesebben tanulmányozottak: GNAT (GCN5-related N-acetyltransferases), MYST (MOZ/Ybf2/Sas3, Sas2 and Tip60) és p300/CBP családok. Emellett ismertek HAT aktivitású fehérjék az általános transzkripciós faktorok és a magi receptorok között is.

Kísérleteinkben a GNAT és p300/CBP enzimescsoport tagjainak specifikus transzkripció szabályozó szerepét vizsgáltuk. Az elsőként leírt hiszton acetiltranszferáz a GCN5 (general control nonderepressible 5), melynek csak gerincesekben előforduló homológja a PCAF (p300/CBP associated factor) (Nagy and Tora 2007). A GCN5 és a PCAF működésükben részlegesen átfednek, azonban különböző szerepet töltenek be például az egér embrionális fejlődésben. Míg a folyamatban a GCN5 esszenciális, addig a PCAF hiányában normál fenotípusú egerek fejlődnek ki. A PCAF deléciója csirke sejtvonalban nem befolyásolta a sejtosztódást, azonban a GCN5 hiánya késleltette azt. A többsejtű eukarióta organizmusokban kifejeződő p300 és CBP (cAMP response element binding protein (CREB) binding protein) fehérjék szintén nagymértékű homológiát mutatnak, de funkcionálisan nem teljesen redundánsak (Iyer, Ozdag et al. 2004; Kalkhoven 2004).

Szemben a specifikus szubsztráttal rendelkező hiszton metiltranszferázokkal, a hiszton acetiltranszferázok több target aminosav módosítására képesek (Kouzarides 2007). A humán rekombináns p300/CBP enzimek *in vitro* a DNS-sel fedett mononukleosómát felépítő hiszton fehérjék következő lizinjeinek acetilációjára képesek: H2AK5, H2BK5, H2BK12, H2BK15, H2BK20, H3K14, H3K18, H4K5, H4K8, H4K12 (Schiltz, Mizzen et al. 1999). *In vitro* a humán PCAF/GCN5 a H3K9, H3K14, H4K5, H4K12 és H4K16-os

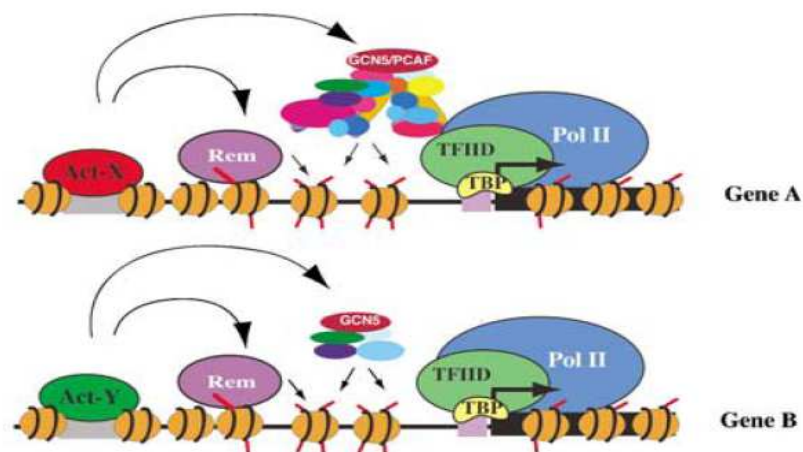
pozícióban lévő acetil lizinek létrejöttét katalizálják a hisztonok N-terminális régióján. (Anamika, Krebs et al. 2010). *In vivo* egér embrionális fibroblasztokban a GCN5 vagy a PCAF hiányában a specifikus acetil lizinek globális szintjében jelentős változás nem mutatható ki, ami a homológ HAT-ok redundanciájára utal (Jin, Yu et al. 2011). Ezzel szemben a kettős mutáns sejtekben jelentősen lecsökkent az acetil H3K9 módosítás mennyisége. A GCN5/PCAF enzimekhez hasonlóan, a p300 vagy a CBP hiányának nincs jelentős hatása a globális hiszton acetilációra, míg a p300/CBP kettős delécioja azt mutatja, hogy ezek a HAT-ok a vizsgált sejtekben specifikusan a H3K18 és H3K27 lizinek acetilációjához szükségesek.

A hiszton acetiltranszferázok mellett, hogy transzkripció koaktivátorként hiszton módosításokat végeznek, nem-hiszton szubsztátokat is acetilálnak, ezzel azok aktivitását és stabilitását szabályozva. A kromatin módosító enzimeknek ez a későbbiekben leírt aktivitása ösztönözte a kutatókat egy új nomenklatura leírására, amelyben lizin acetiltranszferáz (KAT) néven sorolták be többek között a GCN5 (KAT2A), PCAF (KAT2B), p300 (KAT3A) és CBP (KAT3B) enzimeket (Allis, Berger et al. 2007).

Míg a CBP és p300 enzimek monomerként, addig a GCN5 és a PCAF az élesztőtől az emberig konzervált hiszton acetiltranszferáz komplexekben működnek. A SAGA (Spt-Ada-GCN5 containing acetyltransferase) és ATAC (Ada-Two-A containing) komplexek tagjai a katalitikus alegység működését befolyásolják és kölcsönható felületet alakíthatnak ki a különböző szignálútvonalakban szereplő transzkripció aktivátorok részére (Nagy, Riss et al. 2010). A 2 MDa molekulatömegű humán SAGA (korábbi nevén TFTC/STAGA/PCAF komplex) és a 700 kDa molekulatömegű ATAC komplexek alap működési egységének felépítése hasonló (Nagy, Riss et al. 2009). Az ATAC és a SAGA katalitikus alegysége a GCN5 vagy a PCAF; emellett mindkét komplex tartalmazza az ADA3 és SGF29 fehérjéket, valamint a SAGA esetében az ADA2B, az ATAC esetében az ADA2A alegységeket. Humán sejtvonalban vizsgálva, működőképes ATAC vagy SAGA komplexek hiányában egyaránt globálisan lecsökken a H3K9, H3K14 lizinek acetilációs szintje. A komplexek hasonló katalitikus aktivitása ellenére eltérő target gének szabályozásában vesznek részt (Nagy, Riss et al. 2010). Az ATAC nélkülözhetetlen az azonnali korai gének (pl. c-FOS, EGR-1, FRA-1) promóterében a helyes H3 acetilációs mintázat fenntartásához, nem indukált és stressz aktivált körülmények között is. Az UV

indukálta gének (Gamper, Kim et al. 2009) és az endoplazmatikus stressz aktiválta gének promóterében a SAGA mutatható ki (Nagy, Riss et al. 2009). A specifikus HAT komplexek meghatározott gének promóteréhez való kapcsolódásában központi szerepe lehet a szekvenciaspecifikus transzkripció aktivátoroknak (1. ábra) (Nagy, Riss et al. 2009).

A HAT-ok előfordulása különböző génrégiókra jellemző. A p300 és CBP enzimeket főként célgénjeik promóter és enhancer régiójában mutatták ki, míg a PCAF és a GCN5 más acetiltranszferázokkal együtt a szabályozott gének promótere mellett az átíródo régióban is jelen van (Cho, Orphanides et al. 1998; Wang, Zang et al. 2009; Johnsson and Wright 2010). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a p300 és CBP fehérjék a transzkripció iniciációjában, a PCAF és a GCN5 emellett a génátírás elongációjában is szabályozó szerepet játszanak. *In vitro* transzkripció kísérletekben bizonyították, hogy az RNS polimeráz II elongációjához hozzájárul az RSC bromodomén tartalmú ATPáz, melynek működését elősegíti a SAGA és NuA4 HAT komplexek jelenléte (Carey, Li et al. 2006). Az újabb eredmények kiemelik a SAGA komplex acetilációs katalitikus aktivitása mellett hiszton deubikvitináz aktivitásának szerepét az elongáció és ezzel egyidejűleg az átíródo mRNS sejtmagból való transzportjának szabályozásában (Rodriguez-Navarro 2009).



1. ábra. A GCN5/PCAF tartalmú HAT komplexek specifikus gének koaktivátorai (Nagy and Tora 2007). Az eukarióta gének kromatin környezetben való transzkripció aktiválódásának modellje alapján a génspecifikus transzkripció aktivátor (Act-X, Act-Y) promóterhez való kötődése előidéz a

kromatin módosítását végző enzimkomplexek - nukleoszóma remodelling (Rem) és SAGA (felső panel) illetve ATAC (alsó panel) hiszton acetiltranszferáz komplexek- régióhoz való kapcsolódását. Ezek révén a nukleoszómák acetilálódnak (rövid piros vonalak) és ATP függő módon elmozdulnak. Mindezek elősegítik az általános transzkripció faktorok és az RNS polimeráz II transzkripció start helyhez való kötődését. Az ábra forrása: Z Nagy, L Tora, Oncogene (2007) 26, 5341-5357.

2.1.5.2 Hiszton deacetilázok

A hiszton deacetiláz enzimek filogenetikai analízisük alapján négy osztályba sorolhatóak (Gallinari, Di Marco et al. 2007; Ropero and Esteller 2007). Az I (HDAC1, 2, 3, 8), II (HDAC 6, 10, 4, 5, 7, 9) és IV (HDAC11) csoportba tartozó fehérjék Zn-függő hidrolízist végeznek, a sirtuinok (HDAC III) enzimreakciója NAD függő. A hiszton acetiltranszferázokhoz hasonlóan a HDAC-ok szubsztrátjai lehetnek nem-hiszton fehérjék is, így a sejtmag mellett több sejtkompartimentben is előfordulnak. Az I csoport fehérjéi sejtmagi lokalizációjúak és minden szövetben kifejeződnek. A II csoportba tartozó enzimek a sejtmag mellett a citoplazmában is megtalálhatóak és sejttípus függően expresszálódnak. A SIRT1, SIRT6 és SIRT7 enzimek túlnyomórészt a sejtmagban fordulnak elő (Michan and Sinclair 2007; Olmos, Brosens et al. 2010). Míg a SIRT1 az eukromatinnal, addig a SIRT6 a heterokromatinnal asszociált. A SIRT7 a sejtmagvacskában van jelen. A hisztonok deacetilálását is végző SIRT2 főként a citoplazmára, a SIRT3, SIRT4 és SIRT5 a mitokondriumra jellemző.

Aktivitásukat számos poszttranszlációs módosítás mellett nagymértékben befolyásolja, hogy mely makromolekula komplex tagjaként működnek. Deacetiláz aktivitásukra azonban nem minden esetben van szükségük funkciójuk betöltéséhez, így például a II-es csoportba tartozó HDAC-ok gátolhatják a génaktivációt specifikus transzkripció faktorokkal való kölcsönhatásuk révén is (Ropero and Esteller 2007).

A géncsendesítés során a DNS metilációja együtt jár a hisztonok deacetilálásával és a nukleoszóma szerkezet remodeling komplexek általi megváltoztatásával (Johnstone 2002; Jones and Baylin 2007). A DNS metiltranszferázokhoz közvetlenül HDAC enzimek

kapcsolódnak, emellett a metilált CpG szigethez kötődő fehérjék többek között HDAC és nukleoszóma remodeling enzimeket gyűjtenek magukhoz.

2.1.5.3 HAT és HDAC enzimek szerepe a transzkripcióban aktív és inaktív gének szabályozásában

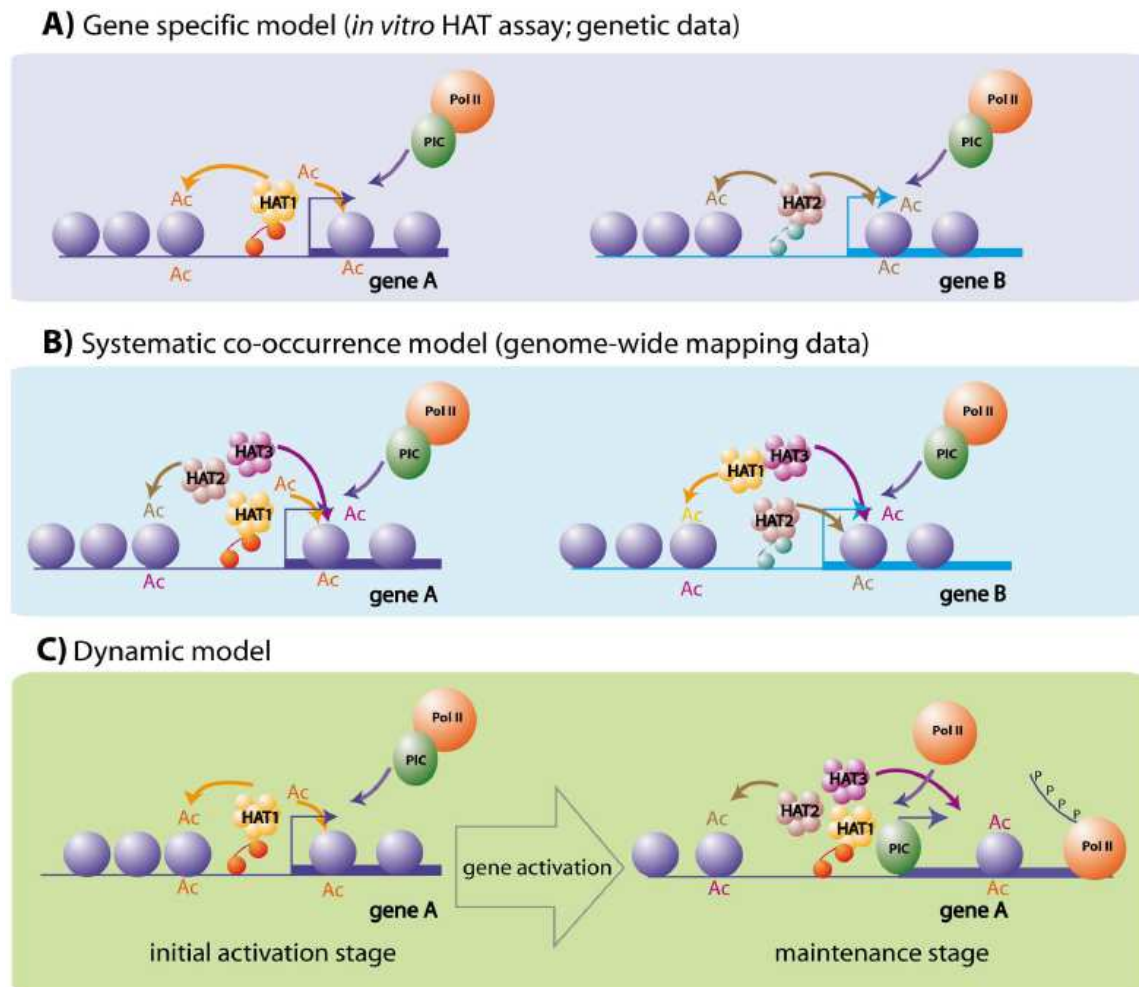
A klasszikus elképzelés szerint a HAT-ok az aktív, a HDAC-ok az inaktív génekhez kapcsolódnak. Ennek alapja, hogy az enzimeket elsőként transzkripció koaktivátorként ill. korepresszorként azonosították. Eszerint a gén aktiválódásakor a promóter régióhoz kapcsolódott HDAC enzimeket hiszton acetiltranszferázok váltják fel. Az újabb vizsgálatok szerint a HAT és HDAC fehérjék egyaránt megtalálhatóak az aktív gének kromatinjában (Hazzalin and Mahadevan 2005; Wang, Zang et al. 2009). Hazzalin és Mahadevan néhány gén kifejeződését vizsgálva azt találták, hogy az indukálható illetve a konstitutívan aktív gének, melyek kromatinja metilált H3K4 hiszton módosítással van megjelölve, dinamikus acetilációnak vannak kitéve (Hazzalin and Mahadevan 2005). Az acetil lizin módosítások szintje az aktívan illetve indukció hatására átíródó gének kromatinjában egyaránt megemelkedik trichostatin A HDAC inhibitor kezelésre, ellentétben a csendes génekkel (Hazzalin and Mahadevan 2005).

Wang és munkatársai a HAT és HDAC enzimek genomi szintű eloszlását kimutató kísérleteikkel alátámasztották a fenti megállapításokat (Wang, Zang et al. 2009). Az aktívan expresszálódó génekhez kötődnek legnagyobb mennyiségben a HAT és HDAC enzimek. A hiszton deacetilázok általi acetil csoport eltávolításra azért lehet szükség, mert a túl magas acetilációs szint destabilizálja a kromatint és kriptikus transzkripció iniciációt válthat ki. Tranziensen mindkét enzimtípus kötődik az inaktív gének azon csoportjához, amelyeket a H3K4 lizin metilációja kijelölt az esetleges aktiválódásra (primed vagy poised gének). A metilált H3K4 lizinnel megjelölt, de időlegesen át nem íródó gének promóter régiójába a HAT enzimek gyakran, de tranziensen kötnek; a HDAC-ok végezve deacetiláció azonban fenntartja az alacsony acetil lizin szintet, ezzel meggátolva az RNS polimeráz II (Pol II) promóterhez kötését (Wang, Zang et al. 2009). A hiszton acetilációs szint emelkedésével párhuzamosan megjelenik a régióban a Pol II, azonban a legtöbb esetben nem indul el a transzkripció, mutatva, hogy ehhez egyéb aktiváló szignálok is szükségesek (Wang, Zang et al. 2009). A csendes gének kromatinjára a H3K27me3

módosítás vagy a módosítások teljes hiánya jellemző, így a HAT és HDAC enzimek nem mutathatóak ki ezeken a szakaszokon (Wang, Zang et al. 2009). Ugyanakkor a korai egyedfejlődés során lejátszódó, Polycomb fehérjék közvetítette géncsendesítés során szükséges a hiszton deacetilázok jelenléte (Tie, Furuyama et al. 2001).

2.1.5.4 A hiszton acetiltranszferázok transzkripció koaktivátor működését leíró modellek

Az egyes hiszton acetiltranszferázok és acetil lizinek genomi szintű jelenlétét leíró tanulmányok (Wang, Zang et al. 2008; Wang, Zang et al. 2009) rámutattak arra, hogy a HAT-ok és acetil lizin módosítások nagy valószínűséggel együttesen fordulnak elő (Anamika, Krebs et al. 2010). A genomikai megközelítés a hiszton acetiltranszferázok redundanciájára utal, azaz egy gén kromatinjában több HAT jelenléte is kimutatható. Ez ellentmond a génspecifikus hatásra utaló genetikai és biokémiai vizsgálatok eredményeinek (lásd 1. ábra). A HAT-ok működésére vonatkozó génspecifikus és redundáns modellek alapján született a génműködés dinamikus modellje (2. ábra). Ez alapján a génátírás iniciációjához génspecifikus hiszton acetiltranszferáz szükséges, amelyet számos HAT kevésbé specifikus bekötődése követ az aktív génműködést fenntartó szakaszban. A modell azt feltételezi, hogy egyes lizinek acetilációja a génátírás feltétele, míg másoké annak a következménye. A szerzők emellett kiemelik, hogy a HAT-ok koaktivátor funkciójának pontos megismeréséhez szükséges annak a vizsgálata, hogy az egyes HAT enzimek mely komplexek részeként kötődnek a génlókuszokhoz.



2. ábra. A hiszton acetiltranszferázok koaktivátor működését bemutató modellek

(Anamika, Krebs et al. 2010). **a**, A biokémiai és genetikai vizsgálatok arra utalnak, hogy az egyes HAT komplexek bizonyos DNS kötő transzkripció aktivátorok révén gének meghatározott csoportját képesek szabályozni. **b**; A genomi szintű vizsgálatok alapján a HAT-ok együttesen alakítják ki a transzkripciósn aktív lókuszon a magas acetil lizin szintet. **c**; A dinamikus modell szerint a HAT-ok kettős szereppel bírnak. A gén aktiválódási szakaszában a transzkripció iniciációjához szükséges a lókuszt specifikus aktivátor révén az adott promóterhez kötődött HAT. Később további HAT-ok bekötődése egy nem specifikus, magas acetiláltsági szintű kromatin kialakulásához, ezzel az aktív transzkripció fenntartásához járul hozzá. Az ábra forrása: Anamika et al., Epigenetics & Chromatin (2010), 3:18.

A fentebb leírt modell teszteléséhez a génaktiválódás időbeli lefolyásának vizsgálata szükséges. Nemrégiben Jin és kutatócsoportja a PPAR δ (peroxisome proliferator-activated receptor) magi receptor indukálta génexpresszió egér embrionális fibroblaszt sejtekben történő vizsgálata során leírta, hogy a hiszton módosítások milyen sorrendben következnek be a génaktiváló kezelést követően (Jin, Yu et al. 2011). Az RNS polimeráz promóteren való megjelenését megelőzte az acetil H3K18 és H3K27 módosítások szintjének emelkedése, ugyanakkor azzal egy időben nőtt a H3K9 lizin acetilációjának mértéke. Kimutatták, hogy a GCN5/PCAF katalizálta H3K9 lizin acetilálódása korrelál a génexpresszióval, de meglepő módon ez a hiszton módosítás nem feltétele a magi receptor aktiválta génkifejeződésnek. Ezzel ellentétben, a p300/CBP kiváltotta H3K18 és H3K27 specifikus lizin acetiláció szükséges az RNS polimeráz promóterhez való bekötődéséhez és a transzkripció iniciációjához. Ezek a kísérletek, összefüggésben a HAT működés dinamikus modelljével, azt igazolják, hogy a GCN5/PCAF és a p300/CBP különböző hiszton acetiltranszferáz aktivitása eltérő funkciójú a génműködés során.

2.1.6 A hiszton acetiláció szerepe a malignus transzformációban

Az abnormális génműködés dedifferenciált sejtek osztódásához, rákos elváltozásokhoz vezethet (Johnstone 2002). A tumoros sejtekben a normál állapottól eltérő génexpressziós mintázatot okozhatja protoonkogének aktiválódása vagy tumorszupresszorok genetikai mutációval történő inaktiválódása mellett a megváltozott kromatin struktúra is. A módosult kromatin szerkezetet eredményező epigenetikai változások éppúgy hozzájárulhatnak a tumor kialakulásához, mint a genetikai változások (Jones and Baylin 2007), hiszen a mitotikusan öröklődő epigenetikus módosulások ugyanolyan szelekciónak vannak kitéve, mint a génmutációk.

A normálistól eltérő kromatinstruktúra kialakulásának hátterében állhat egyebek mellett a HAT, HDAC enzimek funkcionális inaktiválódása, targetspecifitásuk, expressziójuk módosulása (Johnstone 2002). Ismert az enzimek működésének megváltozása mutáció, vírusfehérjével való kötődés, illetve kromoszómatranszlokáció következtében.

2.1.6.1 HAT enzimek szerepe a karcinogenezisben

A hiszton acetiltranszferázok karcinogenezisben betöltött jelentőségére mutat rá, hogy több protoonkogén vagy tumorszupresszor fehérje transzkripció szabályozásában érintettek (Nagy and Tora 2007; Iyer, Ozdag et al. 2004). A GCN5 és PCAF tartalmú HAT komplexek számos protoonkogén transzkripció kofaktorai, így például a c-Myc és az E2F (Nagy and Tora 2007). A p300/CBP enzimek szintén részt vesznek protoonkogének kifejeződésének szabályozásában, például az Myb, Fos, Jun esetében (Kalkhoven 2004). A p53 függő promóterek kölcsönhatnak a SAGA komplexszel és a p300/CBP enzimekkel, illetve a p53 tumorszupresszor maga is acetilálódik a GCN5 által. Kimutatták a BRCA1 (breast cancer 1, early onset) és BRCA2 (breast cancer 2, early onset) tumorszupresszor fehérjéknek a GCN5/PCAF tartalmú HAT komplexekkel és p300/CBP enzimekkel való kapcsolatát. A PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) tumorszupresszor működését szabályozza a fehérje PCAF általi acetilációja (Okumura, Mendoza et al. 2006).

A CBP gén mutációja révén csökkenő HAT aktivitás válthatja ki a Rubinstein-Taybi szindrómát, amely veleszületett fejlődési rendellenességben szenvedőkben magas a daganatos megbetegedések kialakulásának kockázata (Kalkhoven 2004). A p300 működésképtelenségét eredményező szomatikus mutációját számtalan tumortípusban kimutatták (Iyer, Ozdag et al. 2004). Az enzimek funkcióvesztéses mutációi a p300 és CBP tumorszupresszor szerepére utalnak. A p300/CBP HAT-ok tumorgenezisben betöltött komplex funkciójára mutat rá, hogy más vizsgálatok protoonkogénként írták le őket. Így a p300 és CBP mentes fibroblasztok csökkent proliferációs képességet mutattak (Iyer, Ozdag et al. 2004; Dekker and Haisma 2009). Elsődleges nyelőcső karcinóma szövetminták és sejtvonalak átlagosan felében a PCAF hiszton acetiltranszferáz csökkent expressziós szintű, amely allélvesztésnek, a promóter metilálódásának vagy mindkét folyamatnak köszönhető (Zhu, Qin et al. 2009). A GCN5 funkcióvesztéses mutációit rákos sejtekben ezidáig nem mutatták ki (Nagy and Tora 2007).

A MYST3/MOZ (monocytic leukemia zinc finger protein) és a MYST4/MORF (MOZ-related factor) hiszton acetiltranszferáz illetve az MLL (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia) hiszton metiltranszferáz gének kromoszóma transzlokáció révén fuzionálhatnak a p300, CBP vagy TIF2 hiszton acetiltranszferázokat kódoló

génszakaszokkal akut mieloid leukémiás sejtekben (Kalkhoven 2004; Katsumoto, Yoshida et al. 2008), ezzel abnormális génexpressziót kiváltva.

Nemcsak a génkifejeződés, hanem a sejtosztódás szabályozásában betöltött szerepük miatt is érintettek lehetnek a HAT enzimek a daganatok létrejöttében. A p300-nak szerepe van a G1/S átmenetben, melyhez nincs szükség HAT aktivitására (Iyer, Xian et al. 2007). A GCN5 sejtosztódásban betöltött szabályozó szerepe az acetiltranszferáz aktivitáshoz kötődik, azonban nem hisztonok, hanem a ciklinA/Cdk2 komplex módosítását végzi (Orpinell, Fournier et al. 2010). A GCN5 tartalmú ATAC hiányában késleltetett az M/G1 átmenet és számos sejtosztódási rendellenesség figyelhető meg.

Az adenovírusok, az Epstein-Barr, a HIV, a HPV vírusok hiszton acetiltranszferázokkal való kölcsönhatása is szerepet játszik a vírus okozta megbetegedések, így esetlegesen tumor kialakulásában.

2.1.6.2 HDAC enzimek szerepe a karcinogenezisben

A megváltozott HDAC működés egyrészt befolyásolja a hiszton acetiláció szintjét. Ennek következtében tumorszupresszorok kifejeződése represszálódhat, amelyre jól ismert példa a p21 ciklin függő kináz inhibitor inaktiválódása promóterének alacsony acetil lizin szintje következtében (Lane and Chabner 2009). A HDAC enzimek a daganatos megbetegedések kialakulásában a megváltozott hiszton acetiláció mellett a nem-hiszton fehérjék, így például a p53, E2F1, p300 normálistól eltérő acetiláltsága miatt is érintettek. Emellett ismert, hogy a HDAC fehérjék számos gén transzkripcióját szabályozzák transzkripciós faktorokkal (pl. E2F, Stat3, p53, Rb, NF- κ B) való közvetlen kölcsönhatásuk révén.

Több tumortípusban azonosítottak mutáció miatt működésképtelen HDAC2 fehérjét (Ropero and Esteller 2007). Számos esetben leírták, hogy a módosult HDAC aktivitás a megváltozott génexpresszió következménye. Leggyakrabban tumoros sejtekben a HDAC enzimek expressziója megemelkedik, ezzel egyidejűleg a kromatin alacsony acetiláltságú (Lane and Chabner 2009). A HDAC1, 2, 3, 6 fehérjék megemelkedett expresszióját kimutatták különféle rosszindulatú megbetegedésekben. Azonban ezzel ellentétes megfigyelések arra mutatnak rá, hogy a HDAC enzimek működése szövet- és tumorspecifikus. Így invazív emlőrákos betegeket vizsgálva azt találták, hogy a HDAC1 és

HDAC3 magas expressziója a hosszabb túlélési idővel korrelált. Hasonlóan, rosszabb prognózisú a nem kissejtes tüdőrák, ha a HDAC II enzimek alacsony expressziójúak. Ahogy a HDAC I és II csoportba tartozó enzimek esetében, a sirtuin hiszton deacetilázok túltermelődését ill. csökkent expresszióját is egyaránt leírták különböző típusú tumoros sejtekben (Ropero and Esteller 2007). A SIRT2 glioma tumoros sejtekben gyakran csökkent transzkripciós aktivitású. Nyirokcsomó áttétet képző emlőrákos szövetmintákban a SIRT3 és SIRT7 enzimek expressziós szintje szignifikánsan megemelkedett a normál szövethez képest (Ashraf, Zino et al. 2006). A legjobban tanulmányozott sirtuin típusú HDAC, a SIRT1 onkogén aktivitást mutat több *in vitro* kísérletben, de *in vivo* genetikai vizsgálatok alapján egyes tumorok kialakulásában nem játszik szerepet, míg más esetekben meggátolja a malignus transzformációt (Herranz and Serrano 2010).

A HDAC enzimek célgénjeik promóteréhez való kötődését transzkripciós faktorok, magi receptorok, DNS metiltranszferáz enzimek és metilált DNS-t kötő fehérjék irányíthatják. Az aberráns HDAC kötődés tehát számos különböző mechanizmus révén kialakulhat. A legjobban tanulmányozott a kromoszóma transzlokációk következtében kialakuló fúziós HDAC fehérjék megváltozott targetspecificitása (Ropero and Esteller 2007).

2.1.6.3. A tumorsejtek megváltozott epigenetikai szabályozásának következményei a genom szintjén

A tumorsejtekben a hiszton módosító és DNS metilációt szabályozó enzimek megváltozott működése következtében kialakuló aberráns kromatin módosítások nemcsak a tumorsejtek egyedi promótereiben, hanem a teljes genom szintjén is megfigyelhetőek (Seligson, Horvath et al. 2005). Ismert, hogy tumorokban globálisan megváltozik a DNS metilációs mintázata (Fraga, Ballestar et al. 2005; Jones and Baylin 2007). Egyrészt genomi szinten csökken az 5-metilcitozin mennyisége, másrészt diszkrét régiókban hipermetiláltság figyelhető meg. A DNS metiláltságának csökkenése elsősorban a repetitív szekvenciákra jellemző. Ez kromoszóma instabilitáshoz, ezen belül repeat eredetű transzpozonok reaktivációjához vezethet. Ezzel ellentétben egyes gének, pl. tumorszupresszorok promóterében lévő CpG szigetekben a DNS nagyobb mértékben metilálódik, ami a gének represszióját váltja ki.

A DNS metiláció abnormális szabályozásával egyidejűleg a tumoros sejtekben a hisztonok poszttranszlációs módosításainak mennyisége és genomi eloszlása is jellemzően megváltozik az egészséges működésű sejtekhez képest. Fraga és munkatársai számos rákos sejtvonal és elsődleges tumoros szövetminta H4 hiszton poszttranszlációs módosításainak vizsgálatával megállapították, hogy a tumorsejtekben csökken az acetilált H4K16 és trimetilált H4K20 mennyisége (Fraga, Ballestar et al. 2005). Ezek a változások főként a repetitív DNS kromatinjára jellemzőek, ahol a DNS alacsony metiláltsági szintje tumorsejtekben már korábban ismert volt.

Számos típusú tumoros szövetminta globális hiszton módosítási mintázatának vizsgálatával megállapították, hogy egyes módosítások szintje korrelál az adott daganat prognózisával (1. táblázat). Seligson és mtsi megvizsgálták, hogy az agresszívabb fenotípusú tüdő és vese adenokarcinómákban egyes hiszton módosítások globálisan megfigyelt alacsony szintje mely kromoszóma szakaszokra jellemző (Seligson, Horvath et al. 2009). A ChIP-chip kísérletek eredményei korrelálnak Fraga és mtsi korábbi megfigyelésével, ami alapján a fentebbi hiszton módosítások mennyisége azonos a különböző prognózisú mintákban a promóter régiókban, de eltér a DNS repetitív elemeinek kromatinjában.

hiszton módosítás	teljes genomra jellemző mennyiség	tumor típusa (referencia)
H2AK5ac	alacsony	kissejtes tüdőtumor (Barlesi, Giaccone et al. 2007)
H3K9ac	alacsony	prosztatatumor (Seligson, Horvath et al. 2005), emlőtumor (Elsheikh, Green et al. 2009), gliomatumor (Liu, Cheng et al. 2010)
	magas	kissejtes tüdőtumor (Barlesi, Giaccone et al. 2007)
H3K18ac	alacsony	prosztatatumor (Seligson, Horvath et al. 2005), emlőtumor (Elsheikh, Green et al. 2009), hasnyálmirigy adenóma (Manuyakorn, Paulus et al. 2010), vese- és tüdőadenóma (Seligson, Horvath et al. 2009)
	magas	gliomatumor (Liu, Cheng et al. 2010)
H4K12ac	alacsony	prosztatatumor (Seligson, Horvath et al. 2005), emlőtumor (Elsheikh, Green et al. 2009)
H4K16ac	alacsony	emlőtumor (Elsheikh, Green et al. 2009)
H3K4me2	alacsony	prosztatatumor (Seligson, Horvath et al. 2005), emlőtumor (Elsheikh, Green et al. 2009), hasnyálmirigy adenóma (Manuyakorn, Paulus et al. 2010), kissejtes tüdőtumor (Barlesi, Giaccone et al. 2007), gliomatumor (Liu, Cheng et al. 2010), vese- és tüdőadenóma (Seligson, Horvath et al. 2009)
H3K9me2	alacsony	hasnyálmirigy adenóma (Manuyakorn, Paulus et al. 2010), vese- és tüdőadenóma (Seligson, Horvath et al. 2009)
H4K20me3	alacsony	emlőtumor (Elsheikh, Green et al. 2009), gliomatumor (Liu, Cheng et al. 2010)
H3R3me2	alacsony	prosztatatumor (Seligson, Horvath et al. 2005)
H4R3me2	alacsony	emlőtumor (Elsheikh, Green et al. 2009)

1. táblázat. A rossz prognózisú tumorokra jellemző egyes globális hiszton módosítások megváltozott szintje.

2.1.7. HAT és HDAC gátlószer

A génműködés elméletileg mesterségesen szabályozható kiméra transzkripciósfaktorok segítségével, amelyek specifikus DNS szekvenciához kötő elemből és HAT-ok vagy HDAC-ok kapcsolódásához szükséges doménből állnak (Johnstone 2002; Gallinari, Di Marco et al. 2007). Azonban egyetlen gén megfelelő aktivitásának helyreállítása többnyire nem elegendő a tumor kezeléséhez. HDAC és HAT gátlószer használatával szélesebb hatást kifejtve számos gén expressziója befolyásolható.

Több strukturálisan eltérő vegyület a HDAC I, II és IV-es csoportba tartozó enzimek megfelelő gátlószerének bizonyult. A HDAC III csoportba tartozó enzimek eltérő katalitikus mechanizmusuk miatt ezekre az inhibitorokra nem érzékenyek, gátlásukhoz erre a fehérje családra specifikus vegyületek szükségesek (Roper and Esteller 2007; Lane and Chabner 2009). A legtöbb inhibitor több HDAC enzimre képes gátló hatást kifejteni. Pleiotróp tumorellenes hatásukat azáltal fejtik ki, hogy a génexpressziót és a sejtosztódási ciklust befolyásolva képesek a sejtciklus blokkolására, differenciálódási és apoptotikus folyamatok kiváltására, az angiogenezis gátlására. A HDAC gátlószer befolyásolja az endoplazmatikus stressz kiváltotta válaszút vonalakat és a HSP90 (heat shock protein 90) chaperon működésének gátlásával hozzájárulnak onkogén fehérjék lebomlásához. Egészséges és tumoros sejtekben is megemelik a hiszton acetilációs szintet, azonban *in vivo* és *in vitro* sem bizonyultak toxikusnak normál működésű sejtekben. Néhány vegyület preklinikai ill. klinikai tesztelés alatt áll, annak ellenére, hogy a szer terápiás felhasználási körét szűkítheti csendes gének, köztük protoonkogének lehetséges reaktiválódása. A módosításokat katalizáló enzimek együttes gyógyszeres szabályozása szinergisztikus terápiás hatást fejthet ki, például a DNS metilációt gátló 5-azacitidint (5-AC) és a HDAC inhibitor trichostatin A-t (TSA) együttesen lehet használni (Johnstone 2002). Preklinikai és klinikai kísérletek alapján növeli a HDAC gátlószer hatékonyságát, ha hagyományos kemoterápiás szerekkel, ionizáló sugárzással vagy a proteasóma működését gátló anyagokkal kombinációban alkalmazzák (Lane and Chabner 2009).

Viszonylag kevés, főként a p300 és PCAF enzimekre ható HAT inhibitor ismert. A kutatások jelenlegi célja, jobb sejtporositású és nagyobb specitást mutató szer kifejlesztése (Dekker and Haisma 2009). A természetes eredetű curcumin a p300/CBP enzimműködést gátló szer (IC_{50} 25 μ M), amely a PCAF aktivitását nem befolyásolja.

Ennek származéka, a HATi II a p300 hatékonyabb inhibitora (IC_{50} 5 μ M). A garcinol és az anacardia sav olyan természetes vegyületek, amelyek a p300 és PCAF enzimek aktivitását egyformán befolyásolják.

2.2 A többszörös gyógyszerrezisztencia jelensége

A kemoterápia sikertelenségének lehetséges oka a daganatos sejtekben kialakuló többszörös gyógyszerrezisztencia, azaz a sejtek egyidejű rezisztenciája különböző specifitású és kémiai szerkezetű drogokkal szemben (Szakacs, Paterson et al. 2006). A gyógyszerrezisztenciát okozhatja egyrészt az aktív transzporttal a sejtbe jutó vízdékony anyagok csökkent felvétele. Másrészt ehhez vezethetnek a gyógyszer metabolizmusát befolyásoló változások is, pl. a DNS-javítás módosulása. A leggyakrabban leírt mechanizmus szerint a sejtekben megnövekszik a plazmamembránon diffúzióval átjutó hidrofób anyagok energiaigényes kipumpálásának mértéke. Ennek széles körben tanulmányozott esete az ABC (ATP binding cassette) családba tartozó transzporterek fokozott működése.

2.2.1. ABC-transzporterek

Az 1970-es évek óta 48 ABC csatornafehérjét kódoló gént írtak le a humán genomban, melyeket 7 alcsaládba soroltak (A-G). A fehérjék működési egysége 2 transzmembrán (TM) és 2 nukleotidkötő (NB) doménből áll. A TM egységek felelősek a szubsztrát felismeréséért és szállításáért, az NB domének végzik az energiaigényes transzporthoz szükséges ATP hidrolízisét (Vasiliou, Vasiliou et al. 2009). A természetesen előforduló vegyületektől a kemoterápiás szerekgig számos anyag plazmamembránon való transzlokációját végzik. A membráncsatornák hozzájárulnak a normál sejtek detoxifikálásához, a xenobiotikumok elleni védelemhez, de a terápiás szerek szövetekben való eloszlásához, a sejt apoptotikus stimulusra adott válaszához is (Huo, Magro et al. 2010). Jelentőségüket mutatja, hogy 11 ABC transzporter gén olyan súlyos öröklődő betegségekben érintett, mint például a cisztás fibrózis (ABCC7). Számos ABC-csatornafehérje túlműködését figyelték meg drog jelenlétében fenntartott tumoros sejtvonalakban, míg klinikai vizsgálatok alapján daganatos betegekben az ABCB1/MDR1 (multidrug resistance gene 1), ABCC1/MRP1(multidrug resistance associated protein 1), ABCG2/BCRP (breast cancer resistance protein) gének által kódolt fehérjéknek van

szerepe a többszörös gyógyszerrezisztencia kialakításában. Leggyakrabban az MDR1 gén érintett, ezért az MDR1 génről átíródó P-glikoprotein (PgP) részletesen tanulmányozott fehérje.

2.2.2 Magas PgP-szint a kemoterápiás kezelés alatt

A PgP mennyisége számos vizsgálat alapján korrelál a tumor rezisztenciájának mértékével és a tumoros beteg rövidebb túlélési idejével (Baker, Johnstone et al. 2005). Általánosan az emlőrákos sejtek kezdetben reagálnak a kemoterápiás kezelésre, de a későbbiekben kialakuló többszörös gyógyszerrezisztencia miatt rosszabbodik a betegség prognózisa. Klinikai vizsgálatok során megállapították, hogy a kezeletlen emlőrákos sejtek jelentős hányadában kifejeződik a PgP fehérje, melynek megnövekszik a mennyisége a gyógyszeres kezelés következtében (Leonessa and Clarke 2003).

A kemoterápia során kialakuló nagymértékű MDR1 génkifejeződés mechanizmusára több elmélet létezik (Baker, Johnstone et al. 2005). A szelekció és expansió modell azokra a tumorsejtekre vonatkozik, amelyekben az MDR1 alap szinten expresszálódik. Amíg a kemoterápiás szer szelekciós nyomása alatt az alacsony PgP expressziójú sejtpopuláció elpusztul, addig a PgP-t túltermelő sejtek száma megnő. Az aktiválódási modell a szerzett drog rezisztenciára vonatkozik: a drogkezelés közvetlenül kiváltja az MDR1 gén kifejeződését. Más elmélet szerint nem a transzkripció szabályozása változik meg, hanem az MDR1 mRNS stabilitása és transzlációjának szabályozása módosul a kemoterápiás kezelés hatására (Scotto 2003; Yague, Armesilla et al. 2003; Zhu, Wu et al. 2008).

Az MDR1 kifejeződésének növekedését okozhatja genetikai (génamplifikáció, génátrendeződés, random mutáció) és/ vagy epigenetikai változás (kromatin szerkezet változása) (Fojo, Whang-Peng et al. 1985; Scotto, Biedler et al. 1986; Shen, Fojo et al. 1986; Chen, Wang et al. 2005). Számos tumoros sejtvonalban leírták az MDR1 gén és további négy-öt, a többszörös gyógyszerrezisztencia kialakulásához hozzá nem járuló, szomszédos gén amplifikálódását (Scotto, Biedler et al. 1986; Shen, Fojo et al. 1986; Labialle, Gayet et al. 2002; Fairchild, Ivy et al. 1987), azonban csak néhány többszörös gyógyszer-rezisztenciát mutató tumoros páciensben magasabb a 7q21-es kromoszóma régió kópiaszáma (Raguz, Tamburo De Bella et al. 2004). Drogrezisztens sejtkultúrákban

és rákos betegekben egyaránt hozzájárul a gén aktiválódásához az MDR1 gén random átrendeződése is, melynek során az MDR1 gén egy szakasza egy másik kromoszómán lévő, transzkripciósan aktív gén 3' régiójához transzlokálódik (Mickley, Spengler et al. 1997). A drogrezisztencia kialakulásának aktiválódási modelljét, ezen belül a transzkripció közvetlen indukcióját támogatja, hogy sejtvonalak és betegek *in vivo* vizsgálata alapján az MDR1 gén expressziója kemoterápiás kezelés hatására gyorsan aktiválódik (Baker, Johnstone et al. 2005). Tüdő szarkóma metasztázisok kemoterápiás kezelésével *in vivo* mutatták ki, hogy 50 percnyi doxorubicin kezelés elegendő az MDR1 expresszió indukálására (Abolhoda, Wilson et al. 1999). Ugyanilyen körülmények között a nem tumoros tüdősejtek MDR1 expressziójában nem történt változás. Ugyanakkor az újabb vizsgálatok szerint a kemoterápia során aktiválódó MDR1 gén kifejeződése során egyaránt lejátszódik szelekció, génaktiváció és emellett megváltozhat a gén poszttranszkripció szabályozása is (Baker, Johnstone et al. 2005; Chen, Wang et al. 2005).

2.2.3 Az MDR1 gén transzkripció és poszttranszkripció szabályozása

Számos kutatócsoport tanulmányozta az MDR1 promóter aktivitásának szabályozását, a cisz elemeket és a transz ható faktorokat. Az MDR1 gén transzkripciója két promótertől iniciálódhat (Ueda, Clark et al. 1987). Ez általános jelenség, a humán genomban a gének 18 %-a, többek között az ABCG1, ABCG2, ABCA1 gének is, alternatív promóterekről íródhatnak át (Raguz, Randle et al. 2008). Az MDR1 mRNS képződés a legtöbb esetben a downstream promótertől indul. Azonban néhány többszörösen gyógyszerrezisztens sejtvonalban illetve normál működésű és primer tumorszövetből származó sejtekben a fő transzkripció start helytől 112 kb távolságra lévő upstream promóter (UPS) is aktiválódik (Raguz, Tamburo De Bella et al. 2004; Chen, Wang et al. 2005). A promóter működését leírták olyan sejtvonalakban is, ahol nem történt génamplifikáció vagy génátrendeződés. Az UPS normál emlősejtek 10 %-ában és az emlőrákos sejtek 70 %-ában aktiválódik. Az UPS-től iniciálódó transzkripció korrelál az emlőtumor metasztázisával (Raguz, Tamburo De Bella et al. 2004), annak ellenére, hogy az UPS-től átíródó transzkriptum alacsony mennyiségű és szignifikánsan nem befolyásolja a kemoterápia hatékonyságát (Raguz, Randle et al. 2008). Az innen induló transzkripció humán szarkóma sejtekben együtt jár az MDR1 géntől upstream irányban lévő MCFP

(mitochondrial carrier family protein) és RUNDC3/RPIB9 (RUN domain containing 3B/Rap2 interacting protein 9) gének expressziójának aktiválódásával (Chen, Wang et al. 2005; Raguz, De Bella et al. 2005), ami a régió megváltozott kromatin szerkezetével lehet összefüggésben. Az RPIB9 géntermék funkciója ismeretlen, de Raguz és munkatársai kimutatták, hogy az RPIB9 gén expressziója aktiválódik emlőtumoros sejtvonalakban és elsődleges emlőtumorokból izolált sejtekben (Raguz, De Bella et al. 2005). A gén kifejeződése, ahogy az UPS-től való MDR1 átíródás, korrelál a tumor metasztázisával. Az emlőtumorhoz hasonlóan, akut limfoblasztikus leukémiás sejtekben a kontroll sejtektől eltérő többek között az RPIB9 citozin metilációs mintázata is, ami a gén tumoros sejtekben megváltozott expressziós mintázatára utal (Taylor, Pena-Hernandez et al. 2007).



3. ábra. Az MDR1 gén downstream promóter régiójának néhány részletesebben tanulmányozott cisz szabályozó eleme. A promóter elemek számozása a fő transzkripció start helyhez (+1) viszonyítva történt, Labialle, 2002; Scotto, 2003 publikációk alapján.

Amíg az upstream promóter pontos működése kevésbé ismert, addig a downstream promóter régióban számos cisz szabályozó elemet, és az ezekhez kötődő transz-faktort azonosítottak. A downstream promóteren számos egymással átfedő transzkripció faktor köthelyet írtak le, ami arra utal, hogy a szabályozó fehérjék egymással kooperatív vagy kompetitív módon kölcsönhatnak (Labialle, Gayet et al. 2002; Scotto 2003; Chattopadhyay, Das et al. 2008)(2. táblázat). A promóter transzkripció iniciációja TATA box hiányában az iniciátor (Inr) elemtől indul (3. ábra). Ahogy a legtöbb TATA-box nélküli promóter, úgy az MDR1 promótere is tartalmaz fordított CCAAT (Y box) elemet. Az Y-box és a -50GC elem képesek kötni az YB-1 (Y-box-binding protein 1), NF-Y (nuclear transcription factor Y), Sp1 és Sp3 transzkripció faktorokat, amelyek ún. enhanszoszómát képezve hiszton acetiltranszferáz enzimeket gyűjtenek magukhoz. Az említett promóter elemekkel ellentétben a -110GC régió transzkripció represszióért felelős fehérjét képes megkötni. Az upstream irányban lévő CAAT box promóter elemhez

drogérzékeny sejtekben az NF- κ B és cFOS fehérjék gátló komplexe, míg drogrezisztens sejtekben a MEF1 (MDR1 promoter-enhancing factor 1) transzkripciót aktiváló fehérje kötődik. Az 5' irányban elhelyezkedő AP-1 elemhez kötődő fehérjék illetve a C/EBP β (CAAT/ enhancer binding protein β) fehérje az MDR1 génkifejeződés pozitív regulátorai.

Szabályozó faktor	Feltételezett kötődési hely
Sp1 (Sp1 transcription factor)	GC-box -56/-45
Sp3 (Sp3 transcription factor)	GC-box -56/-45
Egr-1 (early growth response protein 1)	GC box -56/-45
WT-1 (Wilm's tumor supressor)	GC box -56/-45
NF-Y (nuclear transcription factor Y)	Y-box -79/-75
YB-1 (Y box binding protein 1)	Y-box -79/-75
UHRF1 (ubiquitin-like with PHD and ring	Y-box -79/-75
p53 (tumor protein p53)	-49/40; -72/62
Ets-1 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogen	-69/-63
AP1 (transcription factor AP-1)	-121/-115
TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer	-1813/-261 régióban 7 TCF
iMED (inverted multiple start site element)	-105/-100
MEF1 (MDR1 promoter-enhancing factor 1)	-118/-111
NFκB/p65 (nuclear factor kappa beta)	CAAT box -116/-113
FOXO3a (forkhead box O3)	-181/+68
HSF1 (heat shock transcription factor 1)	HSE régió -152/-178; -315/-285
HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1)	-49/-45
GR (glucocorticoid receptor)	GRE elem: -96/-83
CEBPβ (CAAT enhancer-binding protein)	-147/-139
SXR (steroid xenobiotic receptor)	-7852/-7837

2. táblázat. Az MDR1 transzkripciójában szerepet játszó szabályozó faktorok és azok feltételezett kötődési helye. A promóter elemek számozása a fő transzkripció start helyhez (+1) viszonyítva történt, Labialle, 2002; Scotto, 2003; Hui, 2008; Jin, 2010 publikációk alapján.

Mivel a különböző stresszhatásokra adott válasz része a xenobiotikumok kipumpálása, az MDR1 kifejeződését indukálják egyes, a stressz válaszhoz kötődő szignálútvonalak (Scotto 2003). Ezzel lehet összefüggésben, hogy az MDR1 gén expressziója gyorsan indukálódik PgP szubsztrátok (pl. doxorubicin) és olyan vegyületek

jelenlétében is, amelyek nem szubsztrátjai a PgP csatornafehérjének (Chaudhary and Roninson 1993). Kimutatták, hogy kemoterápiás szerek a JNK (c-Jun NH₂-terminal protein kinase) közvetítésével képesek aktiválni az AP-1 transzkripciós faktort, amely indukálja az MDR1 kifejeződését (Scotto 2003). Naiv K562 leukémia sejtek doxorubicin kezelése növelte a FOXO3a tumorszupresszor transzkripciós faktor aktivitását, amely indukálta az MDR1 gén kifejeződést (Hui, Francis et al. 2008).

Ismert, hogy a gyógyszerrezisztens sejtek több alternatív downstream transzkripció iniciációs helyet használhatnak, melyet a MED-1 (multiple start site element downstream) elem közvetít (Scotto 2003). Az eddig csak drogrezisztens sejtekben kimutatott MEF-1 (MDR1 promoter-enhancing factor-1) a downstream promóter egy eleméhez kötve képes aktiválni a transzkripciót. Szintén a gyógyszerrezisztens sejtek megváltozott transzkripciós szabályozásának jelentőségét mutatja, hogy az MDR1 kifejeződését negatívan szabályozó kis GTP kötő fehérje, a RAB6C/ WTH3 (member RAS oncogene family) gén működése drogrezisztens sejtekben gátolt (Tian, Jurukovski et al. 2005).

A kemoterápiás kezelés az MDR1 gén expresszióját poszttranszkripciósan is befolyásolhatja (Yague, Armesilla et al. 2003; Zhu, Wu et al. 2008). A poszttranszkripciós szintű génműködés szabályozásban fontos szerepe van a mikro RNS-eknek, amelyek a génexpressziót a specifikus mRNS degradálásával és/ vagy transzlációjának gátlásával szabályozó rövid nemkódoló oligonukleotidok (Zhu, Wu et al. 2008). Nemrégiben kimutatták, hogy a miR-27a és miR-451 mikro RNS-ek aktiválják az MDR1 kifejeződését. Ez az MDR1 transzkripció szabályozásában betöltött közvetett szerepre utal, valószínűleg az MDR1 génrepressziót kiváltó fehérjék expressziójának gátlása révén.

2.2.4. Az MDR1 gén epigenetikai szabályozása

Mivel a transzkripciós faktoroknak az MDR1 promóter elemeihez való kötődése a kromatin szintjén szabályozott (El-Khoury, Breuzard et al. 2007), a génkifejeződés során számos epigenetikai változás lezajlik. Az elmúlt évtizedben vált ismertté, hogy az MDR1 gén transzkripciójának szabályozásában kulcsszerepe van a promóter kromatin acetiláltsági állapotának. A PCAF HAT transzferkciója aktiválja a gén downstream promóterét a fordított CCAAT box régió jelenlétében (Jin and Scotto 1998) és *in vivo* is kimutatták a PCAF promóterhez való kötődését (El-Khoury, Breuzard et al. 2007; Gamper, Kim et al.

2009). *In vivo* kísérletek alapján a p300 és CBP hiszton acetiltranszferázok szintén jelen vannak az aktívan átíródó MDR1 gén promóter régiójában (Jin, Liu et al. 2009). Leírták, hogy az APE1/Ref-1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease 1) DNS javító enzim transz-ható faktorként kölcsönhat a p300 hiszton acetiltranszferáz és az YB-1 transzkripció faktor komplexével valamint az RNS polimeráz II-vel az MDR1 promóter régiójában (Sengupta, Mantha et al. 2011). A hiszton acetiltranszferáz enzimek jelenlétével összefüggésben, az MDR1 génexpresszió során megemelkedik a promóter régió H3 és H4 hiszton acetiláltsági szintje (El-Osta, Kantharidis et al. 2002; David, Yegnasubramanian et al. 2004; Baker, Johnstone et al. 2005; Chen, Wang et al. 2005; Yatouji, El-Khoury et al. 2007; Kim, Kim et al. 2009).

A transzkripciósan nem aktív promóteren a protoonkogén UHRF1 (ubiquitin-like with PHD and ring finger) transzkripció faktor révén kapcsolódó HDAC1 hiszton deacetiláz enzim jelenlétét mutatták ki (El-Osta, Kantharidis et al. 2002; Jin, Liu et al. 2009). Az MDR1 közvetítette drog rezisztencia szabályozásában érintett a SIRT1 hiszton deacetiláz is, de a gén kromatinjában közvetlen deacetiláz működését még nem mutatták ki (Olmos, Brosens et al. 2010). A fehérje megemelkedett mennyiségét számos drog rezisztens tumorban megfigyelték. Kis csoportszámú, kemoterápiás kezelés előtti és utáni tumor szövetminták összehasonlításánál azt találták, hogy a kezeléssel egyidejűleg indukálódik a SIRT1 expressziója (Chu, Chou et al. 2005). A SIRT1 specifikus csendesítésével lecsökkent a PgP kifejeződése, míg a hiszton deacetiláz túltermelésével indukálódott az MDR1 gén expressziója (Chu, Chou et al. 2005). Nemrégiben bizonyították, hogy a SIRT1 és SIRT2 fehérjék által is szabályozott FOXO tumorszupresszor transzkripció faktorok (FOXO3a és FOXO1) fokozzák az MDR1 gén kifejeződését (Hui, Francis et al. 2008; Oh, Cho et al. 2010). Ezzel összefüggésben, a SIRT1 inhibitor amurensin G csökkenti a FOXO1 aktivitását és ezzel az MDR1 expresszióját doxorubicin rezisztens MCF7 sejtekben (Oh, Cho et al. 2010). A korábbi megállapításokkal ellentétben, a SIRT1 p300 hiszton acetiltranszferázzal való kölcsönhatását vizsgálva a SIRT1 MDR1 expressziót gátló hatását írták le (Bourguignon, Xia et al. 2009). Kimutatták, hogy a SIRT1 kötődése inaktiválja a p300 acetiltranszferáz aktivitását, ezzel gátlódik a β -catenin-TCF/LEF (T-cell factor/lymphocyte enhancer factor) transzkripció aktivációs útvonal és az MDR1 expressziója.

Az MDR1 transzkripció hiszton acetiláció általi szabályozásának jelentőségére utal, hogy számos sejtvonalban indukálódik az MDR1 gén expressziója az I-es és II-es csoportba tartozó hiszton deacetilázok gátlásának hatására (Kim, Kim et al. 2009). Az MDR1 gén indukációjához elegendő specifikusan a HDAC1, de nem a HDAC2 gén kifejeződésének csendesítése (Kim, Kim et al. 2009). A hiszton fehérjék acetilációja mellett kimutatták a hiszton metiláció szabályozó szerepét az MDR1 gén kifejeződésében (Huo, Magro et al. 2010). A gén aktiválódását a promóter régió megemelkedett H3K4me szintje kíséri. A specifikusan a H3K4 lizin metilációját katalizáló MLL1 (mixed lineage leukemia 1) metiltranszferáz a fordított CCAAT promóter elem és az NF-Y transzkripció faktor jelenlétében végzi az MDR1 promóter régióban a kromatin módosítását. A metiltranszferáz hiányában lecsökkent, a leukémiás megbetegedésekben kialakuló MLL fúziós fehérje túlermelésével megemelkedett az MDR1 transzkripció mértéke.

A hisztonok poszttranszlációs módosításai mellett a promóter régió DNS metiláltsága is szabályozó szerepű (Nakayama, Wada et al. 1998; El-Osta, Kantharidis et al. 2002; David, Yegnasubramanian et al. 2004; Lee, Park et al. 2008). Az MDR1 gén GC gazdag 5' szabályzó régiója drog rezisztens sejtekben alacsony metiláltságú, míg a promóter régió represszált állapotban metilált és a kromatin deacetilált. A transzkripció magas metil-DNS tartalmú MDR1 promóter esetében TSA által nem aktiválható. Azaz a promóter régióban a hisztonok acetilálódása önmagában nem indukál génexpressziót, csak a szakasz hipermetiláltságának egyidejű csökkenésével.

A drog indukálta MDR1 génkifejeződésben is kimutatták a transzkripció epigenetikus szintű szabályozását. A drog indukció során az MDR1 lókuszt diszkrét régiókban megemelkedik a H3 hiszton acetilációs szintje (Baker, Johnstone et al. 2005). A drogkezelés kiváltotta oxidatív stressz fokozza az APE1 p300 általi acetilálódását, ezáltal az MDR1 promóter régióval való kölcsönhatását (Sengupta, Mantha et al. 2011). A p300 acetilálta APE1 faktor komplexet képez az YB-1 és p300 fehérjékkel és elősegíti az RNS polimeráz II kikötődését. Nem egyértelmű, hogy a drogkezelés befolyásolja-e az MDR1 gén DNS metiláltságát. Míg egyes kísérletekben a doxorubicin DNS hipometilációt okozott (Raguz, Tamburo De Bella et al. 2004), addig máshol nem változtatta meg a promóter CpG metiláltsági állapotát (Baker, Johnstone et al. 2005).

2.2.5 A multidrog rezisztencia kezelési lehetőségei

Több vizsgálat kimutatta, hogy a PgP magas szintjével csökken a tumoros beteg túlélési ideje, így hosszú ideje vizsgálatok folynak a többszörös gyógyszerrezisztencia leküzdésére (Szakacs, Paterson et al. 2006). Klinikai tesztelés alatt néhány olyan szer áll, amelyek a transzporterek működését gátolják, azonban számos egyéb lehetőséget vizsgálnak, amelyek alkalmasak lehetnek a multidrog rezisztens tumorsejtek kezelésére. Az MDR-ben érintett gének kifejeződésének gátlásával megelőzhető lenne a többszörös gyógyszerrezisztencia kialakulása. A PgP transzkripciójának komplex szabályozása eltérő lehet a normál és tumoros szövetekben, mely lehetőséget adhat a tumorspecifikus MDR ellenes terápiára. Kísérletek alapján egyes gének átíródása gátolható a promóterre specifikus mesterséges represszor fehérjével illetve virális vagy nemvirális vektorok segítségével a tumoros szövetbe jutott antiszensz oligonukleotidokkal (Kaszubiak, Holm et al. 2007; Stein, Walther et al. 2008). Mivel az MDR1 gén transzkripciójának szabályozásában több hiszton acetiltranszferáz és hiszton deacetiláz részt vesz, ezek aktivitásának befolyásolása HAT illetve HDAC inhibitorokkal lehetőséget adhat a PgP kifejeződésének gátlására. Erre mutat példát a SIRT1 inhibitor amurensin G MDR1 expresszió csökkentő hatása doxorubicin rezisztens MCF7 sejtekben (Oh, Cho et al. 2010). Multidrog rezisztens MCF7 sejtek transzplantációjával kialakított xenograft egér modellben is az amurensin G alkalmazásával a kemoterápiás kezelés hatékonysága fenntartható (Oh, Cho et al. 2010).

Alternatív multidrog rezisztencia elleni kezelési lehetőség lehet olyan kemoterápiás szerek kifejlesztése, amelyeket a PgP nem ismer fel szubsztrátként illetve a sejtbe jutó drog koncentrációjának emelése a kemoterápiás szerek lipofilicitásának növelésével (Szakacs, Paterson et al. 2006). Ezek mellett a többszörös gyógyszerrezisztencia elleni küzdelemben kihasználható az, hogy az MDR sejtek paradox módon érzékenyebbé válnak néhány anyaggal szemben. Egy másik stratégia alapján a PgP-szubsztrát citoprotektív és a nem-PgP szubsztrát citotoxikus anyagokat együttesen adagolják a multidrog-rezisztenciát mutató és normál sejtekbe (Szakacs, Paterson et al. 2006). Az MDR fenotípusú sejtek kipumpálják a védő vegyületet, míg a normál sejtek nem, így a citotoxikus anyag specifikusan tudja kifejteni a hatását (Blagosklonny 2001). Így például a PgP-t magas szinten kifejező sejtek elpusztultak a nem-PgP szubsztrát apoptózist indukáló szer

jelenlétében, mert a normál sejteket megvédő kaszpáz inhibitort aktív transzporttal eltávolították.

Kísérleteinkben egyrészt a HDAC gátlás hatását tanulmányoztuk a doxorubicin érzékeny és rezisztens sejtvonalakban, másrészt HAT inhibitorok használatával a doxorubicin rezisztens sejtvonal MDR1 expressziójának csökkentésére törekedtünk.

2.2.6. A HDAC gátlás hatása az MDR1 gén expressziójára

Amíg a hiszton acetiltranszferáz inhibitorok csak nemrégiben kerültek forgalomba, a hiszton deacetiláz gátlók (HDACi) hatásmechanizmusa széles körben tanulmányozott. Az általunk alkalmazott trichostatin A potenciális tumorellenes szer, azonban számos adat alapján az MDR1 gén transzkripcióját is képes indukálni, ezáltal multidrog rezisztens tumorsejtek kialakulásához járul hozzá (Kim, Kim et al. 2009). A trichostatin A több HDAC enzimre képes gátló hatást kifejteni, azonban a TSA aktiválta MDR1 expresszióban esszenciális szerepe van a HDAC1 enzim gátlásának (Kim, Kim et al. 2009). A HDACi kezelés hatására megemelkedik az MDR1 promóter régióban a hisztonok acetiláltsági szintje (El-Osta, Kantharidis et al. 2002; David, Yegnasubramanian et al. 2004; Baker, Johnstone et al. 2005; Chen, Wang et al. 2005; Kim, Kim et al. 2009; Yatouji, El-Khoury et al. 2007). Ezzel összefüggésben, a HDAC gátlószerek kiváltotta MDR1 promóter aktiválódásához szükséges az NF-Y transzkripciós faktor kötéséért felelős Y box és a -50GC elemmel kölcsönható Sp1 transzkripciós faktor jelenléte (Jin and Scotto 1998; Kim, Kim et al. 2009). Az említett promóter elemekhez kötődő transzkripciós faktorokról kimutatták, hogy hiszton acetiltranszferáz enzimeket képesek a promóterhez gyűjteni. A HDACi kezelés nem változtatja meg a promóterhez kötött Sp1 fehérje mennyiségét, de elősegíti egy C/EBP β elemből és a PCAF HAT-ból álló koaktivátor komplex kialakulását az MDR1 promóter régiójában (Kim, Kim et al. 2009).

A TSA kezelés nemcsak a hiszton acetilációra kifejtett hatása révén okoz génexpresszió-változást. Ismert hogy a H3 hiszton acetiláció elősegíti a H3K4 lizin metilációját és a HDACi kezelés hiszton H3 és H4 acetiláció mellett H3K4 metiláció kialakulását is indukálja (Nightingale, Gendreizig et al. 2007). A TSA kiváltotta génátírásnál megfigyelték a trimetilált H3K4 hiszton marker mennyiségének emelkedését az MDR1 gén esetében is (Baker, Johnstone et al. 2005; Kim, Kim et al. 2009).

A HDAC gátló kezelés nem változtatja meg az MDR1 promóter CpG metiláltsági állapotát (El-Khoury, Breuzard et al. 2007; Kim, Kim et al. 2009) és csak alacsony DNS metiláltságú promóter esetén képes aktiválni a génexpressziót (El-Osta, Kantharidis et al. 2002; Baker, Johnstone et al. 2005; El-Khoury, Breuzard et al. 2007). Egyes gyomor- és vastagbél eredetű sejtvonalakban sem HDAC gátló (TSA), sem DNS metiltranszferáz gátló (5-AC) kezelésre, sem a kezeléseket kombinálva nem indukálódott az MDR1 kifejeződése (Lee, Park et al. 2008). Többek között ez az eredmény is arra utal, hogy a HDACi kiváltotta MDR1 indukció sejttípus specifikus. Ennek hátterében a PI3K (foszfatidil-inozitol-3-kináz) sejtvonalanként eltérő aktivitása állhat (Kim, Kim et al. 2009).

A TSA közvetetten, az MDR1 kromatin régiójának módosításától függetlenül is kifejtheti hatását. Tian és munkatársai kimutatták, hogy drogrezisztens MCF7 sejtekben TSA kezelés hatására indukálódott az MDR1 negatív regulátorának, a WTH3 fehérjének az expressziója (Tian, Jurukovski et al. 2005). Ebben az esetben a TSA a WTH3 közvetítésével fejt ki MDR1 mRNS szint csökkentő hatását. Ezzel szemben a kissejtes tüdőkarcinómából származó drogérzékeny sejtekben a TSA kezelés az MDR1 gén mellett a WTH3 kifejeződését is stimulálta, így a vizsgált sejtvonalakban ez a represszor nem játszik kulcsszerepet (El-Khoury, Breuzard et al. 2007).

3. Célkitűzések

Célunk az MDR1 gén kódolta PgP kifejeződés epigenetikus szabályozásának vizsgálata volt doxorubicin érzékeny és rezisztens MCF7 sejtvonalakban. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- A drogrezisztens sejtvonal doxorubicin rezisztenciája összefüggésbe hozható-e az MDR1 gén megemelkedett expressziójával? Ha kimutatható az MDR1 mRNS szint növekedés, ez génamplifikációnak, magas promóter aktivitásnak vagy az mRNS megváltozott stabilitásának köszönhető?
- Magas MDR1 promóter aktivitás esetén annak fenntartásában milyen szerepe van az epigenetikus szabályozásnak, ezen belül a hiszton acetilációnak? Korábban is leírták, hogy drogrezisztens sejtekben megemelkedik az MDR1 transzkripciósan aktív promóter régiójában az acetil H3 és acetil H4 hisztonok szintje (Baker, Johnstone et al. 2005; Chen, Wang et al. 2005), azonban nem ismert, hogy mely lizin aminosavakhoz kapcsolódik acetil csoport illetve a promóter kromatinján kívül a gén egyéb régióira milyen hiszton acetilációs módosítás jellemző. Ezért célul tűztük ki az aktív génműködéssel kialakuló acetil lizin mintázat leírását az MDR1 lókuszt meghatározott régióinak kromatinjában és a teljes genomra kiterjedően.
- Hogyan befolyásolja az MDR1 gén expressziós szintjét a hiszton acetiláció módosítása HDAC és HAT inhibitorok segítségével? Lecsökkenthető a drogrezisztens sejtvonalban a magas MDR1 mRNS szint a hiszton acetilációt befolyásoló kezelésekkel?
- Az MDR1 gén hiszton acetilációs mintázatának kialakításában és fenntartásában milyen szerepet töltenek be a p300, GCN5 és PCAF hiszton acetiltranszferázok? Utóbbiak mely HAT komplex részeként vesznek részt az esetleges transzkripció szabályozásban?

4. Felhasznált anyagok és módszerek

Sejtek tenyésztése, kezelése

Az MCF7 emlőkarcinóma sejtvonalat és az abból létrehozott, doxorubicin rezisztens MCF7-KCR sejteket a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézete bocsájtotta laboratóriumunk rendelkezésére. Az MCF7 sejtvonalból két éven át tartó szelekcióval, 10 nM-tól 1 μ M-ig emelve a doxorubicin koncentrációját alakították ki az MCF7-KCR sejtvonalat (Kars, 2006; Molnár, 2008).

A sejteket 37 °C-os, 5% CO₂ tartalmú inkubátorban, a következő tápközegekben tartottuk fenn: RPMI (Sigma), 10% hőinaktivált FBS (Sigma), 4 mM glutamin (Sigma), penicillin, streptomycin és amphotericin B tartalmú 1x antibiotikum-antimikotikum mix (Gibco). Az MCF7-KCR sejtek médiumát minden második héten 1 μ M doxorubicinnel egészítettük ki. A kísérletek előtt a sejteket néhány napig drog-mentes közegben növesztettük. A doxorubicint (Sigma) 1x PBS pufferben oldottuk fel, a használt törzsoldat koncentrációja: 1 mg/ml (1,72 mM).

A 2 mg/ml koncentrációjú trichostatin A (TSA, Sigma) oldat készítéséhez DMSO-t használtunk. A 20 μ g/ml koncentrációjú munkaoldatot abszolút etanolban való hígítással készítettük. A HAT inhibitor II [2,6-bis-(3-bromo-4-hydroxybenzylidene)] (Calbiochem/Merk) 21,5 mM koncentrációjú törzsoldata a vegyület etanolban való feloldásával készült. Az actinomycin D (Sigma) antibiotikumot DMSO-ban oldottuk fel. Az 1 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot instabilitása miatt 1 hónapon belül felhasználtuk.

Sejtek életképességének vizsgálata

A sejtek életképességének vizsgálatához a mitokondrium metabolikus aktivitásán alapuló MTT assay-t használtuk. A 96 lyukú lemezen végzett kísérletben a vizsgálni kívánt vegyületet a sejtekkel 24-72 órán át, 150 μ l térfogatban inkubáltuk, majd az MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma) 1x PBS-ben készített 5 mg/ml koncentrációjú törzsoldatából 20 μ l-t mértük be. 4 órás, 37 °C-on történő inkubálás után a képződött formazán kristályok oldása 100 μ l 10% SDS hozzáadásával, éjszakán át történt. Az 560

nm-en mért abszorbancia mértékét FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) microplate reader segítségével határoztuk meg.

Drog akkumuláció vizsgálata

A sejtvonalak doxorubicin efflux képességének vizsgálatához a sejteket 4 óráig 25 μ M doxorubicin tartalmú közegben tartottuk fenn. A sejtek tripszines összegyűjtése és mosása után az intracelluláris drog mennyiségét FACS készülékkel (FACSCalibur, Beckton Dickinson), az FL-2 csatornán való méréssel, a sejtvonalak drogmentes mintáihoz viszonyítva határoztuk meg. Az adatok értékelése és ábrázolása a CellQuestPro programmal történt.

mRNS izolálása és reverz transzkripciója

A teljes RNS kivonás a Qiagen RNeasy Plus kittel történt, a gyártó utasításai alapján. Genomi DNS szennyeződéstől való megszabadulásra a kitben lévő genomi DNS-kötő oszlopot használtuk. A RNS koncentrációját a NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) segítségével határoztuk meg. A cDNS szintézist 1-2 μ g RNS-ből, random hexamerek és a TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystem, ABI) kit felhasználásával végeztük.

Kvantitatív polimeráz láncreakció (QPCR)

Az mRNS expressziós szint meghatározása és a kromatin immunprecipitáció (ChIP) során kivont DNS minták vizsgálata real-time (valós idejű) kvantitatív PCR-rel történt. A kísérletekhez az ABI StepOne Real-Time PCR rendszere állt rendelkezésre. A PCR-termékek detektálására a SYBR Green és a TaqMan módszereket egyaránt alkalmaztuk. A SYBR Green alapú detektálás esetén a Power SYBR Green PCR master mixet (ABI) használtuk. A 15 μ l végtérfogatú reakciókeverék primerpártól függően 50-500 nM koncentrációban tartalmazta a szekvensspecifikus oligonukleotidokat. A használt primereket a 3. és 4. táblázat foglalja össze. Az alkalmazott PCR reakció-körülmények: 10 perc 95 °C hőaktiválás, majd 50 amplifikációs ciklus: 15 másodperc 95 °C, 45 másodperc 60 °C. Az ezt követő olvadáspont-analízis a keletkezett termékek minőségét határozta meg. A GCN5 és az MRP1 gének esetében TaqMan próbát alkalmaztunk a keletkező PCR termékek kimutatására, TaqMan PCR Master Mix (ABI) reagenst használva.

A cDNS minták normalizálásához endogén kontrollként két háztartási gén expressziós szintjét vizsgáltuk: 18S rRNS és glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH). Az egyes gének expresszióját relatív kvantitálással határoztuk meg, az úgynevezett komparatív C_T (threshold cycle) vagy $\Delta\Delta C_T$ módszert használva. A 2-6 független kísérlet eredményeinek statisztikai kiértékeléséhez az Excel Student t-tesztjét alkalmaztuk. Az ábrákon * jelöli a szignifikáns változásokat (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$).

Primerpár neve	forward	Reverz	optimális koncentráció (nM)
RPIB prom	AGC TTC AGT GCC TGC CTA GA	ATT CTA CGA GCA ATT CCC CC	200
MDR up. prom	CCC TAA GCC ATG TAA CTC TTC G	TGA CTA TGG CTC CAA AGC AT	200
minus exon	CTC ACT TCA GGA AGC AAC CA	TTT TTA CTG AGA TGA AAC CAA AGA A	400
MDR down.prom	GCA GTG GTC TTT CTT CAG CA	AAA AAC ACG GGC ATT GAT CT	200
MDR exon1-1	ACC TGT TTC GCA GTT TCT CG	GAA GAG CCG CTA CTC GAA TG	100
MDR exon1-2	GCT TTC AGA TTT CCT GAA CTT GGT	CTT CAC ACT ATC CAC GCC TCA A	100
MDR exon7	CGA CAG GAG ATA GGC TGG TT	ACA CGA CAT TGT TGC TGC TT	400
MDR 3UTR	TGT CCA AAC TGC CTG TGA AT	TCC AAG AAG AAT GAA GCC AGA	400
c-FOS prom	TTG AGC CCG TGA CGT TTA CAC T	TTC TCA GAT GCT CGC TGC AGA T	400
nontranscribed	TAC ACC ACT CAA GGG AAA CTG GAA	TGG AAC TTC TGG AAG ACA CTG GAA	400

3. táblázat: A genomi DNS-re specifikus primerek szekvenciasorrendje és optimális koncentrációja. Az oligonukleotidok szekvenciája 5'-3' irányú.

primerpár neve	forward	Reverz	optimális koncentráció (nM)
MDR1 downs_mRNA	CCA GAA GGC CAG AGC ATA AG	CTG TGA TTG CAT TTG GAG GA	100

MDR1 ups_mRNA	TAT TCA GAT ATT CTC CAG ATT CC	TCCGACTTTAGTGGAAA GACCTAA	200
RPIB9	ACC CTG ATT GAT CGG TCT TG	CCC AGA AGC TAC GAG GAC TTT	400
PCAF	GCC CTA GCT GCT CAT GTT TC	GGT TTT TCA AAT GGG GGT TT	200
cFOS	GGG GCA AGG TGG AAC AGT TAT C	TAG TTG GTC TGT CTC CGC TTG G	50
ADA2B	CTG CGG GAT GAT TAC GAG AT	CGC CTT TTC CTT CTC CTT CT	50
18S rRNS	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	CGC TCC CAA GAT CCA ACT AC	50
GAPDH	ACC TGA CCT GCC GTC TAG AA	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	100
RARa	CAGCATCCTGTCCTTGC AGGCTT	AGTCCAAGTAAGAGAAC ACCCTGGG	200
P300	CAGATTGATCCCAGCTC CATA	AAA GAA GAC TCG GCG TTT GA	100
HDAC1	TGACGAGTCCTATGAGG CCATT	CCGCACTAGGCTGGAAC ATC	100
HDAC2	TGTGAGATTCCCAATGA GTTGC	GGTAACATGCGCAAATT TTCAA	200
HDAC3	GAA AAC CTG AAG ATG CTG AAC C	TCC TTG TCA TTG TCA TGG TCT C	100
HDAC4	GAGGTTGAGCGTGAGCA AGAT	TAGCGGTGGAGGGACAT GTAC	200
HDAC5	GTCTCGGCTCTGCTCAG TG TAGA	GGCCACTGCGTTGATGT TG	400
HDAC8	CCAAGAGGGCGATGATG ATC	GTGGCTGGGCAGTCATA ACC	100
HDAC10	ATCTCTTTGAGGATGAC CCCAG	ACTGCGTCTGCATCTGA CTCTC	200
HDAC11	CAATGGGCATGAGCGAG AC	TGTGGCGGTTGTAGACA TCC	100
SIRT1	GCAGATTAGTAGGCGGC TTG	TCTGGCATGTCCCACTA TCA	100

SIRT2	TCGCAGAGTCATCTGTT TGG	GCTTGAAGTGTCCAGGA TAG	50
SIRT6	ACGTCCGAGACACAGTC GTGGG	CTAGGATGGTGTCCCTC AGCTCTCC	100
SIRT7	CGCCAAATACTTGGTCG TCT	GTGATGCTCATGTGGGT GAG	200

4. táblázat: A cDNS-re specifikus primerek szekvenciasorrendje és optimális koncentrációja. Az oligonukleotidok szekvenciája 5'-3' irányú.

MDR1 gén kópiaszámának meghatározása

Az MCF7 és MCF7-KCR sejtekből fenol-kloroform extrakcióval genomi DNS-t vontunk ki, és QPCR reakcióban egyenlő mennyiségeket felhasználva abszolút kvantifikálással határoztuk meg az MDR gén kópiaszámát. Az ehhez szükséges ismert kópiaszámú mintákat a következőképpen készítettük el: Az MDR1 exon1-1 és MDR1 exon7 primerpárokkal felszorzozott genomi DNS fragmentumokat pJET1.2blunt vektorba (Fermentas) ligáltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A konstrukciókkal DH5 α kompetens sejteket transzformáltunk, majd a plazmid DNS-t HiSpeed plasmid midi kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk. A konstrukció helyességét emésztéssel ellenőriztük. A plazmid DNS koncentrációjának és molekulatömegének segítségével meghatároztuk a kópiaszámot, a következő képlet alapján: $[\text{DNS tömege (g)} * 6,022 \times 10^{23} (\text{mol}^{-1})] / [\text{DNS hossza (bp)} * 660 (\text{g/bp} * \text{mol})]$. A plazmid DNS-ből készített hígítási sorozatot használtuk fel az abszolút kvantifikáláshoz.

Antitestek, Western blot

A 5. táblázat foglalja össze a Western blothoz alkalmazott antitesteket. A kromatin immunprecipitációhoz ugyanezeket az ellenanyagokat használtuk, kivéve az anti-acetil H3K9 specifikus antitestet (Diagenode).

A hiszton fehérjék savas extrakcióját az Abcam protokollja szerint végeztük (http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Histone_extraction_protocol.pdf). Ennek alapja, hogy a hisztonok, más magi fehérjéktől és a nukleinsavtól eltérően, savas közegben oldott állapotban maradnak (Shechter, Dormann et al. 2007). A protokollt röviden összefoglalva,

a sejteket előbb HDAC inhibitort tartalmazó (5 mM Na-butirát) 1x PBS pufferben összegyűjtöttük, majd a sejtpelletet 0,5% Triton-X-100 detergenst és proteáz gátlót tartalmazó pufferben felfuszpendáltuk. A sejtlízist követően a sejtmagokat lecentrifugáltuk és a savas extrakció 0,2 N HCl felhasználásával, éjszakán át történt. Valamennyi lépés 4 °C-on folyt.

A hiszton vagy teljes fehérje kivonatok koncentrációját a NanoDrop spektrofotométerrel határoztuk meg. Egyenlő mennyiségeket választottuk el a hiszton fehérjék vizsgálatakor 15%-os, a teljes fehérjekivonatok analízisének 8 %-os SDS tartalmú poliakrilamid gélen a Mini-PROTEAN Tetra cell rendszer (BioRad) segítségével. Ezt követően a mintákat elektrotranszferrel blotoltuk Mini Trans-blot (BioRad) rendszer felhasználásával hiszton kivonatok esetében 0,2 µm, a teljes fehérjekivonatok esetében 0,45 µm pórusátmérőjű nitrocellulóz membránra (Trans-Blot Transfer Medium, BioRad). A membrán blokkolásához és az ellenanyagok hígításához 1x PBS-ben feloldott 3 %-os tejpor oldatot vagy az ellenanyag gyártójának utasítása szerinti oldatot használtunk. A membránon létrejött fehérje-ellenanyag komplexek kimutatása kemilumineszcens reakció alapján történt, Immobilon Western (Millipore) tormaperoxidáz szubsztrát reagens és röntgenfilm (Kodak) segítségével.

Ellenanyag	Forgalmazó/ előállító	Használt hígítás
H3	Abcam	1:10 000
H3K4ac	Millipore	1:5000
H3K9ac	Millipore	1:5000
H3K14ac	Millipore	1:5000
H4	Millipore	1:10 000
H4K8ac	Abcam	1:10 000
H4K12ac	Abcam	1:500
GCN5	IGBMC	1:1000
PCAF	IGBMC	1:1000
ADA2B	IGBMC	1:1000

Aktin	Sigma	1:5000
-------	-------	--------

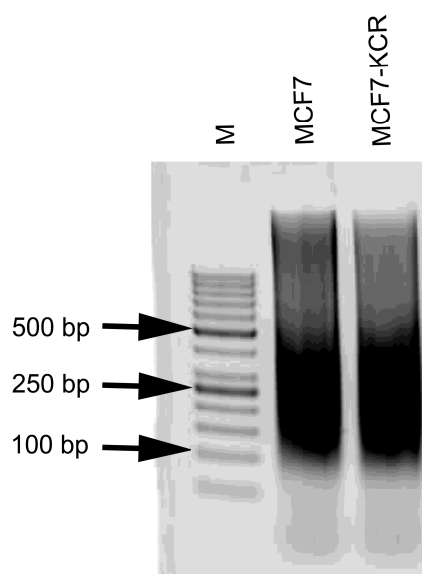
5. táblázat: A Western blot kísérletekben használt elsődleges ellenanyagok listája és azok hígításai.

Kromatin immunprecipitáció (ChIP)

A kromatin működésének, összetételének vizsgálatára gyakran alkalmazott módszer a kromatin immunprecipitáció (ChIP) (Collas 2009). A ChIP technika segítségével meghatározható, hogy a vizsgálni kívánt fehérje adott DNS szekvenciákhoz kötődik-e, így alkalmas poszttranszlációsán módosított hisztonok, hiszton variánsok, transzkripció faktorok, kromatin módosító enzimek jelenlétének kimutatására adott génlókusz vagy a teljes genom szintjén. A kromatin immunprecipitációs kísérleteket az Acetyl-Histone H3 Immunoprecipitation Assay Kit (Upstate/Millipore) komponenseivel végeztük a gyártó utasításainak megfelelően, kisebb módosításokkal. Röviden összefoglalva, minden egyes ChIP kísérlethez 2×10^6 sejtet használtunk. A fehérje-DNS kapcsolat formaldehiddel való keresztkötése után a sejteket lízis pufferekkel tártuk fel, amelyekhez proteáz inhibitorokat (PMSF- phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma és PIC- proteáz inhibitor koktél, Sigma) illetve 150 ng/ml koncentrációban hiszton deacetiláz inhibitor (trichostatin A) adtunk. Ezt követően a kromatint a BioRuptor (Diagenode) szonikátor segítségével 200-500 bp hosszú darabokra fragmentáltuk. A szonikált DNS méretét a keresztkötés feloldása és DNS preparálást követően gélelektroforézissel ellenőriztük (4. ábra).

A kromatin 4°C -on, 1 óráig történő előtisztításához a lazac sperma DNS-sel blokkolt, 50 %-os protein A agaróz oldatból 60 µl-t használtunk. A megfelelő mennyiségű ellenanyag hozzáadása után az antitest/antigén/DNS komplex kialakuláshoz éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a mintát. A lazac sperma DNS-sel blokkolt, 50%-os protein A agarózzal (60 µl) megkötött komplex mosása és a gyöngyökről való eluálása után a keresztkötés feloldása 65°C-on, 4 órás inkubálással történt. A DNS csapadékot a fenol/kloroform extrakció és az etanolban való kicsapás után 80 µl 1x TE pufferben oldottuk fel. A QPCR reakció templatjaként 2,5 µl DNS kivonatot mértünk be.

Az egyes ChIP-QPCR reakciók elemzésénél a C_T értékek segítségével számoltuk ki, hogy a bevitt (input) DNS kontrollhoz képest mennyi DNS precipitálódott az adott mintában (input%). A bevitt DNS mérésére az immunprecipitáció nélküli kromatin minta 1%-a szolgált. Az immunprecipitált minta saját bevitt DNS kontrolljához való normalizálására a következő formulát használtuk: $2^{(-\Delta C_T)}$, ahol $\Delta C_T = C_{T \text{ [immunprecipitált minta]}} - C_{T \text{ [input]}}$. A 2-6 független kísérlet eredményeinek statisztikai kiértékeléséhez az Excel Student t-tesztjét alkalmaztuk. Az ábrákon * jelöli a szignifikáns változásokat (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$).



4. ábra. A kromatin fragmentálását követő DNS-méret ellenőrzése. A szonikálást követően a DNS-fehérje keresztkötést feloldjuk, majd a DNS-t proteáz kezelés után fenol-kloroform extrakcióval tisztítjuk és méretét 1%-os agaróz gélen ellenőrizzük. M-DNS molekulásúly marker

Kis interferáló RNS (siRNS) alapú géncsendesítés

A GCN5 (Ambion), ADA2B (Ambion) és PCAF (Dharmacon) specifikus valamint a negatív kontrollként alkalmazott, specifikus régióhoz nem kapcsolódó (Dharmacon) siRNS oligonukleotidok transzfekciójához DharmaFECT 1 (Dharmacon) siRNS transzfekciós reagenst használtunk, a gyártó utasításainak megfelelően. A GCN5 siRNS molekulák a gén 5. illetve 15. exonjára specifikus oligonukleotidok. Az ADA2B és PCAF

siRNS molekulák a specifikus gének 2. exonjaihoz képesek hibridizálni. A protokollt röviden összefoglalva, a sejtek osztása után 24 órával 4 µl DharmaFECT reagens és 50 nM siRNS oligonukleotid Opti-MEM szérumentes médiumban inkubált keverékét mértük az antibiotikum-antimikotikum mixet nem, de szérumot és glutamint tartalmazó, 2 ml térfogatú RPMI tartalmú tenyésztőedénybe. Médiumcsere nélkül, 48 óra elteltével az RNS szintű, illetve 72 óra után a fehérje szintű változásokat vizsgáltuk teljes RNS illetve fehérje kivonat készítésével.

5. Eredmények

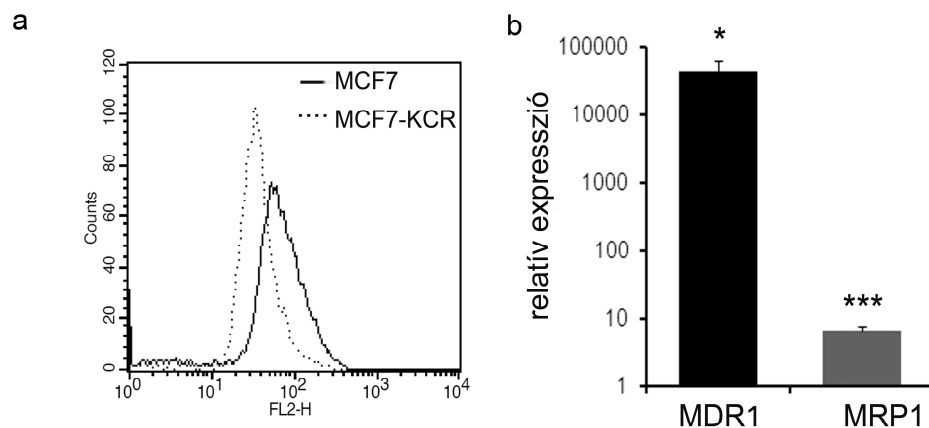
5.1 Az MDR1/ABCB1 vagy MRP1/ABCC1 gének megnövekedett kifejeződésének illetve a gének amplifikációjának lehetséges szerepe a doxorubicin rezisztenciában

Az MCF7 emlőkarcinóma sejtvonal érzékeny a kemoterápiás szerekre, azonban számos drogrezisztens alvonalat hoztak létre belőle (Fairchild, Ivy et al. 1987). Vizsgálatainkhoz a doxorubicin kemoterápiás szerre rezisztens MCF7-KCR sejteket használtuk, melyet az MCF7 sejtekből fokozatos drogszelekcióval alakítottak ki (Kars, Iseri et al. 2006). A sejtvonalak jellemzéseként először meghatároztuk, milyen mértékben gátolja a drog a doxorubicin érzékeny és rezisztens sejtek életképességét. A doxorubicin a DNS szálak közé interkalálódó, ezáltal DNS károsodást kiváltó antraciklin drog (Kars, Iseri et al. 2006). Az MTT assay alapján amíg a doxorubicin fél-gátló dózis (ID_{50} half inhibitory dose) értéke az MCF7 sejtekben $0,5 \mu M$, addig az MCF7-KCR sejtekben $50 \mu M$ (nem ábrázolt adatok). Ezzel összefüggésben, a drog akkumulációs vizsgálat szerint a drogérzékeny sejtekben magasabb a doxorubicin intracelluláris koncentrációja (5. a ábra).

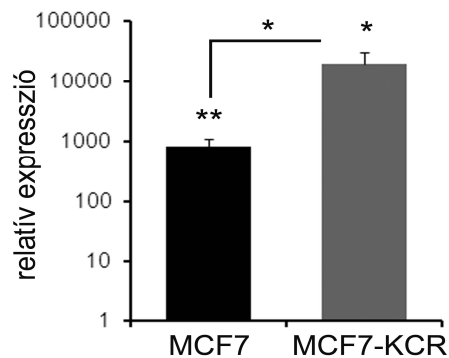
Az MCF7-KCR sejtvonal nagymértékű doxorubicin rezisztenciájának kialakulásában szerepe lehet az MDR1 vagy MRP1 gének fokozott transzkripciójának. A génexpresszió vizsgálatához mRNS-t tisztítottunk a sejtvonalakból és reverz transzkripció kapcsolt QPCR-t (RT-QPCR) végeztünk, exon specifikus primerek használatával. Azt találtuk, hogy az MDR1 mRNS szintje 5 nagyságrenddel magasabb a drogrezisztens MCF7-KCR sejtekben, mint a drogérzékeny MCF7 sejtekben (5. b ábra). Ezzel szemben az MRP1 transzkripciójában egy nagyságrendnyi különbség van a két sejtvonal között. Az MDR1 upstream promóter aktivitásának meghatározásához az ezt követő (-1) exon tartalmú mRNS szintjét vizsgáltuk RT-QPCR kísérletben. Ez alapján egyik sejtvonalban sem aktiválódott a downstream promótertől 112 kb távolságra lévő upstream transzkripció start hely (ábrán nem mutatva).

Az MDR1 upstream transzkriptumának mennyisége mellett megvizsgáltuk az ezzel a promóterrel átfedően, a DNS másik száláról átíródó RPIB9/ RUNDC3B gén

kifejeződésének mértékét, melynek expressziója emlőtumoros sejtekben aktiválódik (Raguz, Tamburo De Bella et al. 2004). Emlőkarcinóma sejtvonalaink mellett meghatároztuk az U2OS oszteoszarkóma sejtvonalban is a gén expressziós szintjét. A vártak megfelelően, az RT-QPCR kísérletek alapján az MCF7 sejtekben az U2OS sejtekhez képest nagymértékben megemelkedett az ezidáig ismeretlen funkciójú gén mRNS szintje (6. ábra). A drogrezisztens sejtvonalban a drogérzékeny sejtvonalhoz képest további 25-szörös mértékben nőtt a génexpresszió szintje.



5. ábra. A drog akkumuláció mértékének illetve az MDR1 és MRP1 drog transzporter gének expressziójának összehasonlítása MCF7 és MCF7-KCR sejtekben. a, A sejtek fluoreszcenciáját a 4 órás, 25 μ M koncentrációjú drogkezelést követő FACS analízissel határoztuk meg, a kiértékeléshez a CellQuestPro programot használtuk. A grafikonon a 3 független kísérlet egy reprezentatív mérési eredménye szerepel. **b,** A gének mRNS szintjét RT-QPCR-rel vizsgáltuk 3 független kísérletben. Az ábrán a 18S rRNS endogén kontrollhoz való normalizálás utáni, MCF7 sejtekben mért értékekhez viszonyított relatív expresszió van feltüntetve. A grafikon y tengelye logaritmikus beosztású. * jelöli az MCF7-KCR sejtvonal MCF7 sejtektől szignifikánsan eltérő értékeit.

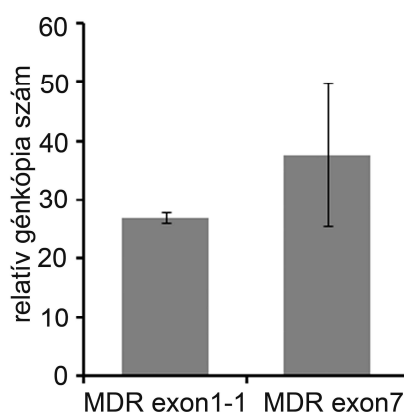


6. ábra. Az RPIB9 gén expressziójának összehasonlítása MCF7, MCF7-KCR és U2OS sejtekben. A gén mRNS szintjét RT-QPCR-rel vizsgáltuk. Az ábrán a 18S rRNS endogén kontrollhoz való normalizálás utáni, U2OS sejtekben mért értékhez viszonyított relatív expresszió van feltüntetve. A grafikon y tengelye logaritmus beosztású. * jelöli az MCF7 és MCF7-KCR sejtvonalak U2OS sejtektől szignifikánsan eltérő értékeit.

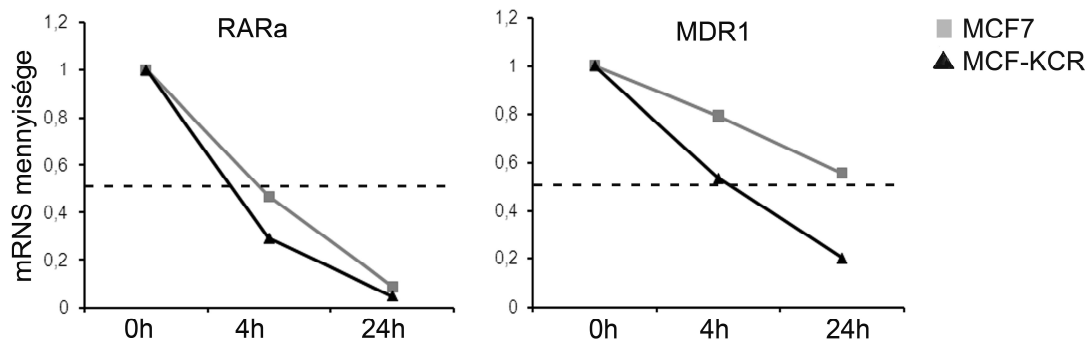
A nagymértékű MDR1 mRNS expresszióhoz hozzájárulhat a gén amplifikációja, ezért genomi DNS-t preparáltunk, majd kvantitatív PCR segítségével összehasonlítottuk az MCF7 és MCF7-KCR sejtvonalak MDR1 kópiaszámát (7. ábra). Megállapítottuk, hogy a gén harmincszoros kópiaszámban van jelen a drogrezisztens sejtekben az MCF7 sejtekhez képest. Az abszolút kvantifikálással kapott eredményeket relatív QPCR segítségével is megerősítettük (nem ábrázolt adat). Mindez arra utal, hogy minden egyes génkópiáról körülbelül 2500-szoros mennyiségben képződik transzkriptum az MCF7-KCR sejtvonalba. Tehát a megnövekedett MDR1 mRNS-szint részben a génamplifikációnak köszönhető, de valószínűleg epigenetikai változások is hozzájárulnak a magas MDR1 promóter aktivitáshoz.

A drogrezisztens sejtek magas MDR1 mRNS szintje több esetben nem kizárólag az aktív génműködésnek köszönhető (Yague, Armesilla et al. 2003; Baker, Johnstone et al. 2005). K562 mieloid leukémia és CEM-Bcl2 T-sejtes leukémia sejtvonalakban kimutatták, hogy drog-indukció és drog-szelekció hatására az MDR1 gén kifejeződésének

poszttranszkripciós szabályozása változik meg. Ennek következtében az MDR1 mRNS stabilizálódik, illetve felszabadul a transzlációs blokk alól. Az általunk összehasonlított sejtvonalakban ezért megvizsgáltuk, hogy a magas MDR1 transzkriptum szinthez nem járul-e hozzá az mRNS féléletidejének megnövekedése a drogrezisztens sejtekben. Ennek során actinomycin D transzkripció gátlószerezrel megakadályoztuk az új transzkriptumok képződését, és meghatároztuk a meglévők mennyiségét a kezelést követően 4 és 24 órával később (8. ábra). A kontrollként vizsgált, rövid féléletidejű RARa mRNS hasonló stabilitása az actinomycin D kezelés hatékonyságát mutatja mindkét sejtvonalban. Az MDR1 mRNS stabilitásában eltérés mutatkozik a drogérzékeny és drogrezisztens sejtvonalak között. Mivel az MCF7 sejtekben hosszabb a transzkriptum féléletideje, az MCF7-KCR sejtek magas MDR1 mRNS szintjét nem a képződött mRNS stabilitásának megemelkedése, hanem a gén megnövekedett transzkripciós aktivitása okozhatja.



7. ábra. Az MDR1 gén kópiaszámának összehasonlítása MCF7 és MCF7-KCR sejtvonalakban. A sejtekből genomi DNS-t vontunk ki, majd QPCR reakcióban egyenlő mennyiségeket felhasználva abszolút kvantifikálással határoztuk meg az MDR gén kópiaszámát, a gén első (MDR exon1-1) és hetedik (MDR exon7) exonjára specifikus primerek segítségével. Az ábrán az MCF7-KCR sejtek 2 kísérlet alapján számolt átlagos relatív génkópia száma szerepel, az MCF7 sejtvonal értékeihez való viszonyítás után.

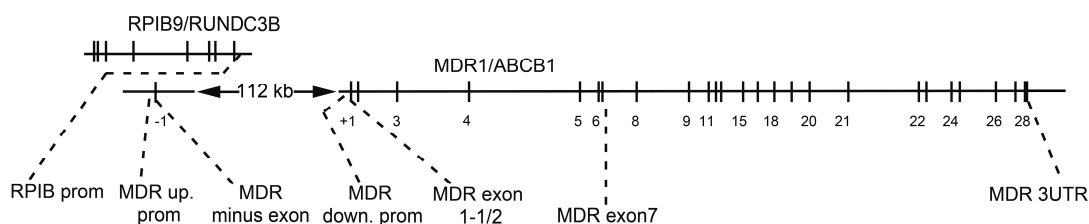


8. ábra. Az MDR1 mRNS féléletidejének összehasonlítása MCF7 és MCF7-KCR sejtvonalakban. Álkezelt kontroll és 10 µg/ml actinomycin D transzkripció gátlószerral kezelt MCF7 (szürke négyzet) és MCF7-KCR (fekete háromszög) sejtekből 4 és 24 óra elteltével RNS-t izoláltunk. RT-QPCR reakcióval határoztuk meg az MDR1 és kontrollként a rövid féléletidejű RARα gének mRNS szintjét. Az ábrán a 18S rRNS endogén kontrollhoz való normalizálás utáni, álkezelt mintához viszonyított relatív mRNS mennyiség van feltüntetve.

5.2 A megnövekedett génműködéshez epigenetikai változások járulhatnak hozzá

Az MDR1 transzkripció epigenetikai szabályozásának tanulmányozásához a gén egyes régióira jellemző hiszton acetilációs mintázatot kromatin immunprecipitáció (ChIP) segítségével vizsgáltuk. Az acetil lizin specifikus ellenanyagokkal precipitált, majd tisztított DNS preparátumban kvantitatív PCR reakcióval határoztuk meg az MDR1 specifikus régiók mennyiségét. Az upstream és downstream promóterre, a promóterek utáni első exonokra, a kódoló régióban (ún. géntestben) lévő hetedik exonra és a 3' UTR (untranslated region) régióra specifikus primereket alkalmaztunk. Emellett vizsgáltuk az MDR1 upstream promóter régiójával átfedően, a DNS másik száláról átíródó gén, az RUNDC3B/RPIB9 gén promóterét (9. ábra). Pozitív kontrollként az aktívan átírt és magas hiszton acetiláltságot mutató cFOS gén promóterét (Hazzalin and Mahadevan 2005) vizsgáltuk (az ábrán nem mutatva). A cFOS a retrovirális vFos protoonkogén homológja (Milde-Langosch 2005). A Fos-család tagjai a Jun fehérjével dimerizálódva hozzák létre

az AP-1 transzkripciós faktor komplexeket. A cFOS, mint azonnali korai gén (IE), gyorsan és tranziensen indukálódik a mitogének vagy stressz hatására aktiválódó mitogén aktiválta protein (MAP) -kináz kaszkád részeként (Lee and Mahadevan 2009). Az MCF7 emlőkarcinóma sejtek proliferálódásának feltétele a növekedési faktorok jelenlétében kialakuló, cFOS tartalmú AP-1 komplex jelenléte, amely a ciklin D és E2F fehérjék expresszióját szabályozza (Lu, Shen et al. 2005; Shen, Uray et al. 2008). Számos drogrezisztens sejtvonalban a cFOS transzkripciós aktivitása megemelkedett a drogérzékeny sejtvonalakhoz képest (Scotto 2003), azonban az MCF7 és MCF7-KCR sejtekben a gén egyformán magas expressziós szintű (nem ábrázolt adat). Negatív kontrollként a 6-os kromoszóma egy át nem íródó intergenikus régióját használtuk (az ábrán nem mutatva).

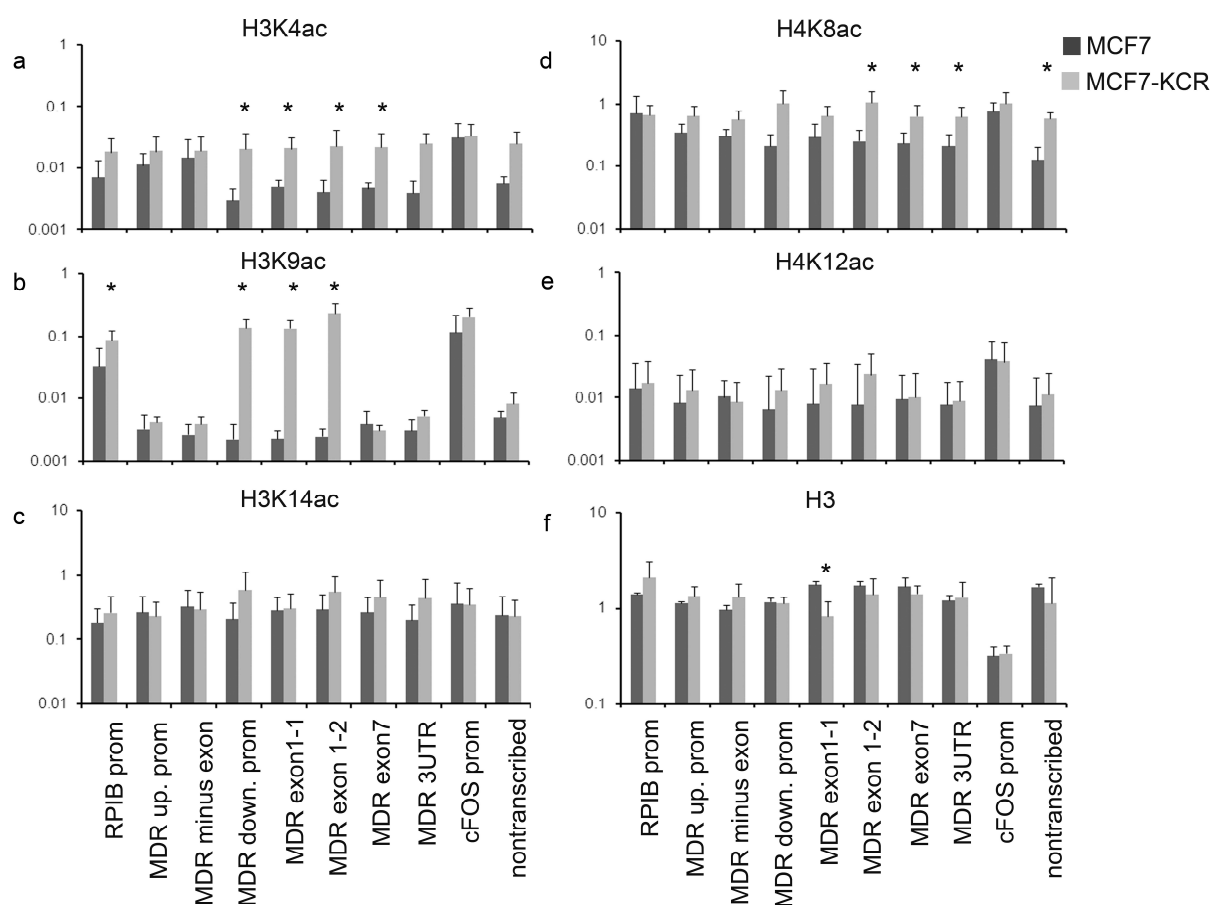


9. ábra. Az MDR1 gén szerkezete. Az alsó vonal az ABCB1/MDR1, a felső vonal a DNS másik száláról, az MDR1 génnel átfedően átíródó RUNDC3B/RPIB9 gén szerkezetét mutatja. A keresztvonalak az exonokat szimbolizálják, melyek közül néhány számmal jelölt. A legalsó sorban a ChIP utáni kvantitatív PCR-hez felhasznált primerek neve és pozíciója van feltüntetve, a negatív és pozitív kontrollként vizsgált régiókra specifikus primerek kivételével.

ChIP kísérleteink során azt találtuk, hogy az MDR1 vizsgált régióiban az acetilált H3K4 mennyisége az MCF7 sejtvonalban átlagosan csak kétszer magasabb, mint az ellenanyag nélkül precipitált, a nem specifikus ún. háttér kötődést mutató negatív kontroll minta értéke (az ábrán nem mutatva). Ezzel szemben a kontroll cFOS gén promóter régiójában átlagosan ötször magasabb a vizsgált acetil lizin szintje, mint a többi tanulmányozott régióban (10. a ábra). Tehát az MCF7 sejtekben az MDR1 gén

kromatinjában alacsony az acetil H3K4 lizin mennyisége. Az MCF7-KCR sejtvonalban enyhén magasabb a H3K4 lizin acetilációs szintje az MDR1 downstream promóter, az első exon és a hetedik exon régióiban, mint az MCF7 sejtvonal ezen kromatin szakaszain. Az acetilált H3K9 mennyisége, hasonlóan az acetil H3K4 lizin mennyiségéhez, alacsony a drogérzékeny sejtekben az MDR1 gén teljes kromatinjában a cFOS promóter régióhoz viszonyítva (10. b ábra). Azonban a drogrezisztens sejtvonalban kiemelkedően magas a downstream promóter és az első exon régióiban a módosítás mértéke; az MDR1 gént alapszinten kifejező sejtvonalhoz képest 60-szor, illetve 110-szer több acetilált H3K9 lizin van jelen az MDR1 mRNS-t túltermelő sejtvonal ezen régióiban. Az MCF7-KCR sejtekben kismértékű szignifikáns emelkedést mutattunk ki az RPIB9 gén promóter régiójában is az MCF7 sejtekhez képest. Az acetil H3K14 módosítás hasonló mértékben van jelen mindkét sejtvonalban, valamennyi tanulmányozott MDR1 és kontroll kromatin szakaszon (10. c ábra). A H4K8 acetilált lizin mennyisége kis mértékű, szignifikáns emelkedést mutat a drogrezisztens sejtvonalban az MDR1 első és hetedik exon, a 3'UTR és a negatív kontroll régiók kromatinjában a drogérzékeny sejtvonalhoz viszonyítva (10. d ábra). Az acetil H4K12 szintjében szignifikáns különbséget nem mutattunk ki a sejtvonalak között, a módosítás az át nem íródó génszakasszal megegyező mértékben mutatható ki az MDR1 gén kromatinjában, szemben a négyszer nagyobb értéket mutató cFOS promóterrel (10. e ábra).

A DNS nukleoszómákkal való fedettségének vizsgálatára poszttranszlációs módosítástól független, H3 hiszton specifikus ellenanyaggal határoztuk meg a hisztonok mennyiségét. A két sejtvonalban az egyes régiók hasonló H3 hiszton szintje azt igazolja, hogy az acetil lizinek mennyiségi különbsége nem az adott kromatinszakasz eltérő nukleoszómaszámának következménye (10. f ábra). A drogrezisztens sejtvonalban az MDR1 első exonjában és mindkét sejtvonalban a cFOS promóter régiójában alacsonyabb a H3 hiszton mennyisége, ami azzal magyarázható, hogy az aktívan átíródó gének transzkripció iniciációs helye nukleoszómamentes (Kouzarides 2007) és a transzkripció start hely környezetében lecsökken a nukleoszómák száma (Wang, Zang et al. 2009). A ChIP kísérletek eredményeit összegezve, a vizsgált hiszton módosítások közül a drogrezisztens sejtek megnövekedett MDR1 expressziós szintjével leginkább a H3K9 lizin acetilációs szintje korrelál.

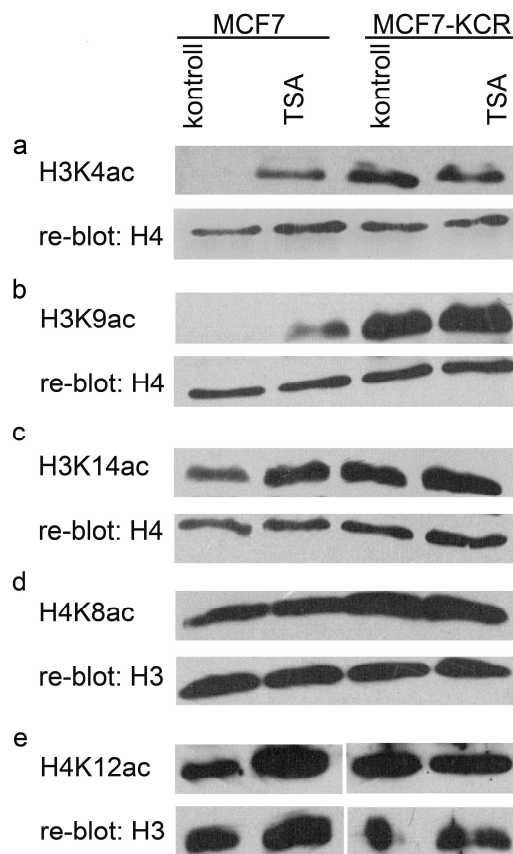


10. ábra. Specifikus acetil lizin módosítások szintje az MDR1 gén meghatározott régióiban és kontroll gének kromatinjában. MCF7 (sötétszürke) és MCF7-KCR (világosszürke) sejtekkel H3K4ac (a), H3K9ac (b), H3K14ac (c), H4K8ac (d), H4K12ac (e) és H3 (f) ellenanyagokkal kromatin immunprecipitációt végeztünk. A precipitált DNS mennyiségét kvantitatív PCR reakcióban határoztuk meg, majd a bevitt (input) kromatin százalékaként kifejezve tüntettük fel. Az ábrán 2 -5 független kísérletről számolt átlag és szórás szerepel, * jelöli az MCF7-KCR sejtek azon értékeit, amelyek szignifikánsan eltérnek az MCF7 sejtekben mért értékektől.

Mivel az MDR1 gén kromatinjában az egyes acetil lizinek szintjében nagy eltérést mutattunk ki a sejtvonalak között, kíváncsiak voltuk, a genomi szintű hiszton acetiláció mértékében látható-e különbség a drogérzékeny és drogrezisztens sejtek között. A Western

blot kísérletekben összehasonlítottuk a drogérzékeny és drogrezisztens sejtekben a H3K4ac, H3K9ac, H3K14ac illetve H4K8ac és H4K12ac acetil lizinek mennyiségét (11. a, b, c, d, e ábrák, 1. és 3. oszlop). Azt találtuk, hogy amíg az alacsony MDR1 expressziójú sejtvonalban az acetilált H3K4 és H3K9 alig mutatható ki, addig azonos körülmények között ezeknek igen magas szintje detektálható az MDR1 gént túlexpresszáló sejtvonalban. Nagyobb mennyiségben van jelen az MCF7 sejtekben az acetilált H3K14, H4K8 és H4K12, de ezek szintje éppúgy magasabb az MCF7-KCR sejtekben. A drogrezisztens sejtekben kimutatott magasabb genomi hiszton acetiláltság arra utal, hogy a vizsgált hiszton módosítások kialakításának ill. fenntartásának a szabályozása az MCF7-KCR sejtekben eltér a kiindulási MCF7 sejtvonalhoz képest.

A globális és az MDR1 gén szintű hiszton acetiláltság vizsgálata különbségeket tárt fel a drogérzékeny és drogrezisztens sejtvonalak között. A többszörös gyógyszerrezisztencia epigenetikai szabályozásának további tanulmányozásához trichostatin A (TSA) hiszton deacetiláz gátlószerrel kezeltük a sejteket. A Western blot kísérletek azt mutatják, hogy a kezeletlen kontroll drogérzékeny sejtvonalban tapasztalt alacsony globális acetiláltsági szint a TSA kezelt sejtekben a H3K4, H3K9 és H4K12 lizinek esetében nagymértékben, míg a H3K14 és a H4K8 lizinek esetében kisebb mértékben megemelkedik (11. a, b, c, d, e, ábrák). Így megközelíti vagy eléri az MCF7-KCR sejtekben tapasztalt acetil lizinek mennyiséget, de azt nem haladja meg. A drogrezisztens sejtekben a hiszton acetiláltság genomi mértéke nem változott. Ezek az adatok egyrészt azt mutatják, hogy az általunk használt TSA-koncentráció hatékony, a várt hatást váltja ki a doxorubicin érzékeny sejtekben. Másrészt a doxorubicin rezisztens sejtekben a változatlan szintű hiszton acetiláció arra utal, hogy a magas acetil lizin szint tovább már nem emelhető.



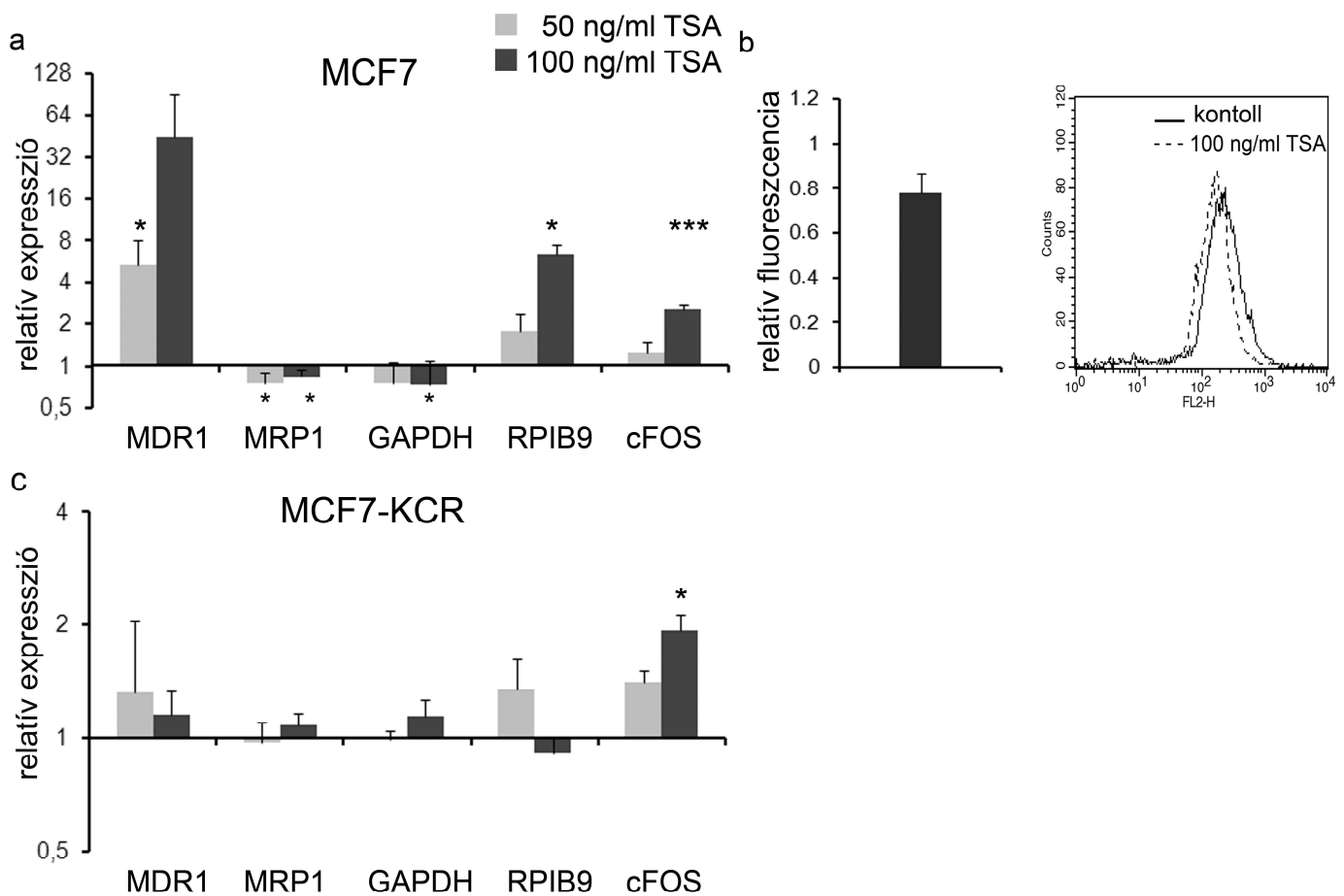
11. ábra. A specifikus hiszton acetiláltság genomi szintű vizsgálata kontroll és TSA kezelt MCF7 és MCF7-KCR sejtekben. A 24 óráig DMSO-val álkezelt és 50 ng/ml trichostatin A-val kezelt MCF7 és MCF7-KCR sejtekből hiszton kivonatot készítettünk, majd 10-10 µg fehérjeminta és acetil H3K4 (a), acetil H3K9 (b), acetil H3K14 (c), acetil H4K8 (d) és acetil H4K12 (e) ellenanyagok felhasználásával Western blot kísérletet végeztünk. Belső kontrollként ugyanazon a membránon a módosítatlan H3 ill. H4 hiszton mennyiségét vizsgáltuk.

5.3 Hiszton deacetiláz gátlás génexpresszióra és a hiszton acetiláltságra kifejtett hatása eltérő a vizsgált sejtvonalakban.

A következőkben a hiszton deacetiláz gátlás génexpresszióra kifejtett hatását vizsgáltuk meg. Az általunk használt trichostatin A-ról, mely több típusú HDAC enzim inhibitora, kimutatták, hogy számos gén expresszióját befolyásolva képes a sejtciklus blokkolására, sejt differenciálódási és apoptotikus folyamatok kiváltására (Johnstone 2002). Ezek alapján ígéretes tumorellenes terápiás szer lehet, azonban az újabb tanulmányok

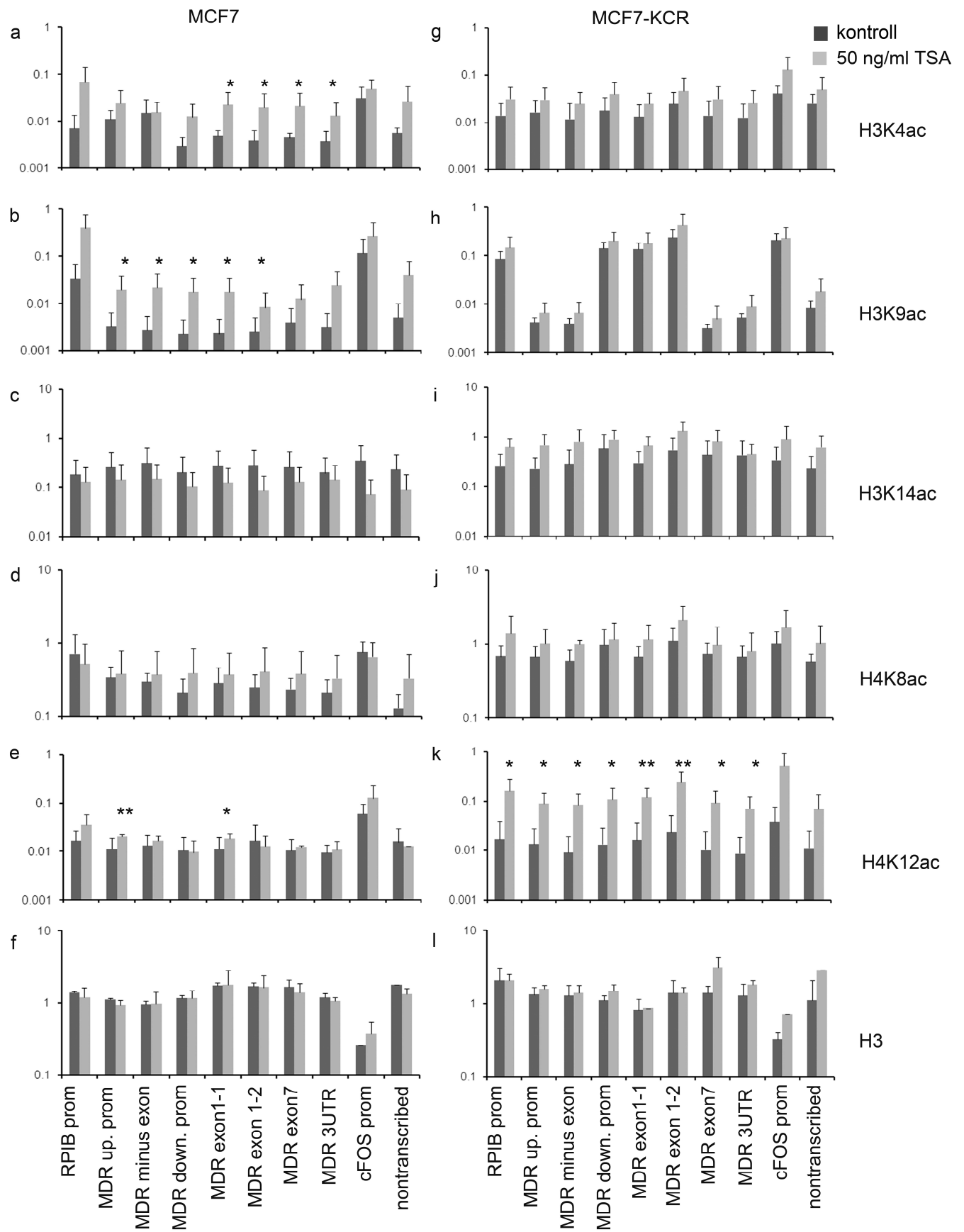
szerint a TSA az MDR1 gén transzkripcióját is képes indukálni, ezáltal hozzájárul a multidrog rezisztens tumorsejtek kialakulásához (Kim, Kim et al. 2009).

24 órás TSA kezelés után meghatároztuk az MDR1 és MRP1, az MDR1 upstream promóterrel átfedő RPIB9 és kontrollként a GAPDH és cFOS mRNS-szintjét. A relatív génexpresszó szintjét, a 18S rRNS endogén kontrollhoz való normalizálás után, az álkezelt kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg. A drogérzékeny sejtvonalban a TSA kezelés MDR1 expressziót indukált, az irodalmi adatoknak megfelelően (12. a ábra). A doxorubicin akkumuláció mértékét meghatározó FACS analízis alapján a képződő mRNS-ből termelődő transzporter fehérje működőképes (12. b ábra). A magasabb TSA-koncentráció hatására kismértékű RPIB9 és cFOS mRNS szint növekedés is történt. Ezzel szemben a drogrezisztens sejtvonalban a TSA kezelés nem okozott nagymértékű génexpresszió változást egyik vizsgált gén esetében sem (12. c ábra).



12. ábra. A TSA kezelés hatása a génexpresszióra. MCF7 (a) és MCF7-KCR (c) sejtek 24 órás kontroll (DMSO), 50 ng/ml (halványszürke) és 100 ng/ml (sötétszürke) koncentrációjú TSA kezelése után a feltüntetett gének mRNS szintjét vizsgáltuk RT-QPCR-rel. Az ábrán a 18S rRNS endogén kontrollhoz való normalizálás utáni, álkezelt kontrollhoz viszonyított relatív expresszió szerepel. * jelöli a kezelt minták kontrolltól szignifikánsan eltérő értékeit. b, MCF7 sejtek 24 órás kontroll (DMSO) és 100 ng/ml koncentrációjú TSA kezelése után FACS analízissel vizsgáltuk a doxorubicin akkumuláció mértékét. A bal oldali grafikonon a 3 független kísérletből számolt, a kontroll mintához viszonyított relatív fluoreszcencia intenzitás értékeinek átlaga szerepel. A jobb oldali ábrán egy reprezentatív mérés eredménye látható.

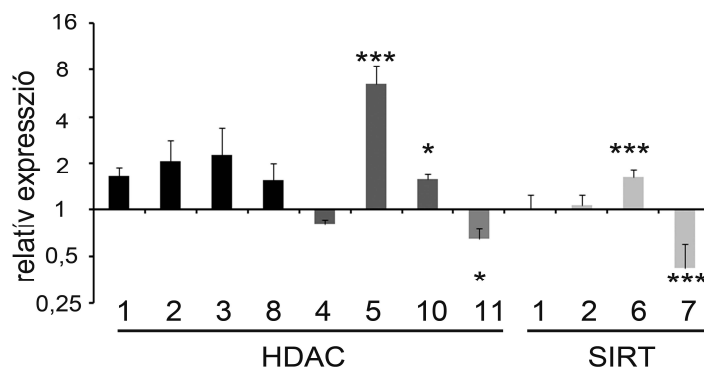
Annak kimutatására, hogy a TSA okozta génműködés-változás hátterében áll-e epigenetikai változás az MDR1 kromatinjában, acetil lizin specifikus kromatin-immunprecipitációt végeztünk. A HDAC inhibitor hatására az MCF7 sejtekben specifikus régiókban szignifikánsan megemelkedett a H3K4 és H3K9 lizinek acetiláltságának mértéke (13. a, és b, ábrák). Az acetil H3K4 módosítás esetében az RPIB9 gén promóter régiójában 10-szeres, az MDR1 gén első exon, hetedik exon és 3' UTR génszakaszok kromatinjában átlagosan ötszörös növekedést tapasztaltunk. A TSA hatására MCF7 sejtekben kialakuló acetil H3K4 szint a transzkripció start helyet követő és a géntestben lévő exon kromatinjában a kezeletlen MCF7-KCR sejtekre jellemző mértéket éri el. A H3K9 lizin acetiláltsági szintje a promóterek és a promótereket követő első exonok kromatinjában emelkedett meg, átlagosan hatszoros mértékben. Ez azonban a kezeletlen MCF7-KCR sejtekhez képest a downstream promóter és az első exon esetében tízszer illetve körülbelül húszszor alacsonyabb acetiláltsági szintet jelent. Az acetil H3K14, acetil H4K8 és acetil H4K12 mennyiségében jelentős szignifikáns változás nem történt a TSA kezelés hatására (13. c, d, e, f, ábrák). Az MCF7-KCR sejtek esetében a H3K4, H3K9, H3K14 és H4K8 lizinek acetiláltsága hasonló mértékű a kezeletlen és HDAC gátlószerrel kezelt mintákban, azonban a kontrollhoz képest valamennyi RPIB9 és MDR1 specifikus régióban szignifikánsan, átlagosan tízszer magasabb a H4K12 acetiláltsága a TSA kezelést követően (13. g-l ábrák). Az MCF7 sejtekben tapasztalt acetil H3K4 és H3K9 szint növekedés korrelál a TSA hatására indukálódó MDR1 és RPIB9 expresszióval, míg az MCF7-KCR sejtekben bekövetkező acetil H4K12 módosítás mennyiségének emelkedésével egyidejűleg nem történik génexpresszió változás.



13. ábra. Az MDR1 gén meghatározott régióinak hiszton acetilációs mintázata kezeletlen és TSA kezelt mintákban. Kezeletlen (sötétszürke) és TSA kezelt (világosszürke) MCF7 (bal oldal) és MCF-KCR (jobb oldal) sejtekkel, H3K4ac (a, g), H3K9ac (b, h), H3K14ac (c, i), H4K8ac (d, j), H4K12ac (e, k) és H3 (f, l) ellenanyagok felhasználásával kromatin immunprecipitációt végeztünk. A precipitált DNS mennyiségét kvantitatív PCR reakcióban határoztuk meg, majd az input kromatin százalékaként kifejezve tüntettük fel. Az ábrán 2 -5 független kísérletből számolt átlag és szórás szerepel, * jelöli az TSA kezelt sejtek azon értékeit, amelyek szignifikánsan eltérnek a kezeletlen sejtekben mért értékektől.

5.4 A HDAC gének kifejeződésének szerepe a drogrezisztens sejtek megváltozott hiszton acetilációs szintjének szabályozásában.

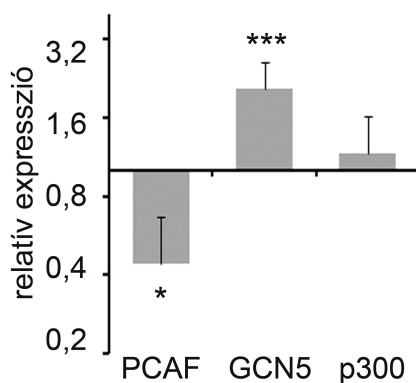
A globális és az MDR1 gén szintű hiszton acetiláltság vizsgálatával különbségeket mutattunk ki a drogérzékeny és drogrezisztens sejtvonalak között; az MCF7-KCR sejtekben specifikus acetil lizinek szintje megemelkedett a teljes genom és az MDR1 gén kromatinjában is. A magas globális hiszton acetilációs szintet a megemelkedett HAT aktivitás és/vagy a lecsökkent HDAC aktivitás okozhatja. Az egyes HDAC csoportba tartozó gének expresszióját vizsgálva azt találtuk, hogy az MCF7-KCR sejtekben a HDAC5 gén kifejeződése 6, 5-szeres mértékben megemelkedett, ugyanakkor a SIRT7 gén expressziója 40%-ra lecsökkent az MCF7 sejtekben mérhető szintjükhöz képest (14. ábra). Emellett kismértékű szignifikáns mRNS szint emelkedés mutatható ki a HDAC10 és SIRT6, illetve csökkenés a HDAC11 gén esetében. A leírt HDAC expressziós mintázat azt mutatja, hogy a drogrezisztens sejtekben megváltozott egyes hiszton deacetiláz enzimek kifejeződése, mely szerepet játszhat az egyes specifikus acetil lizinek szintjének nagymértékű megemelkedésében.



14. ábra. Hiszton deacetilázok expressziós szintjének vizsgálata MCF7 és MCF7-KCR sejtvonalakban. A HDAC I (HDAC1, 2, 3, 8), II (HDAC4, 5, 10), III (SIRT1, 2, 6, 7) és IV (HDAC11) -es csoportba tartozó gének mRNS szintjét RT-QPCR-rel vizsgáltuk. Az ábrán a 18S rRNS endogén kontrollhoz való normalizálás utáni, MCF7 sejtekben mért értékekhez viszonyított relatív expresszió van feltüntetve. A grafikon y tengelye logaritmusos beosztású. * jelöli az MCF7-KCR sejtvonal MCF7 sejtektől szignifikánsan eltérő értékeit.

5.5 PCAF és GCN5 hiszton acetiltranszferázok gátlásának génexpresszióra kifejtett hatása eltérő a vizsgált sejtvonalakban.

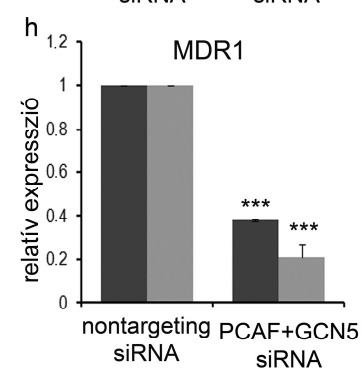
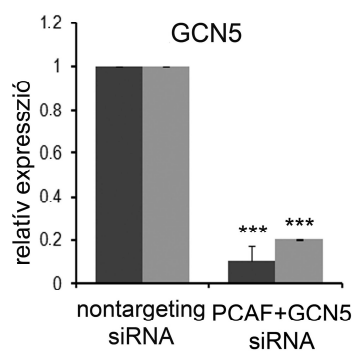
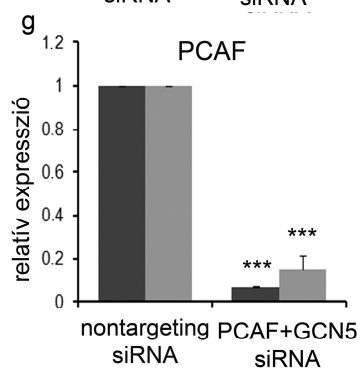
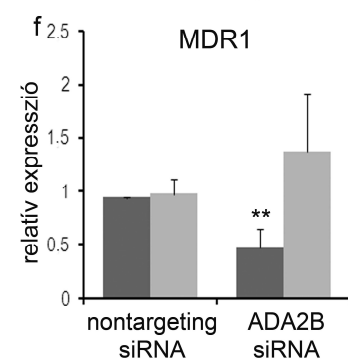
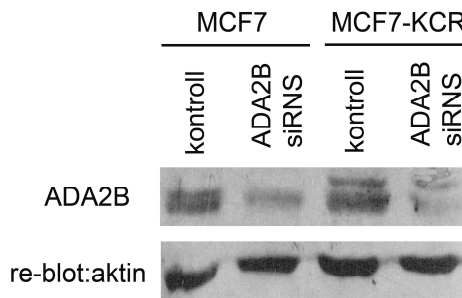
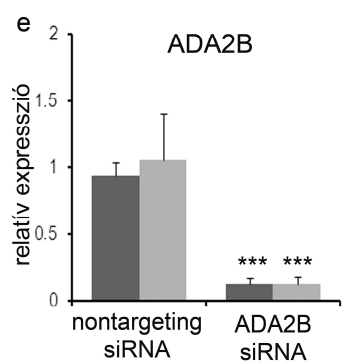
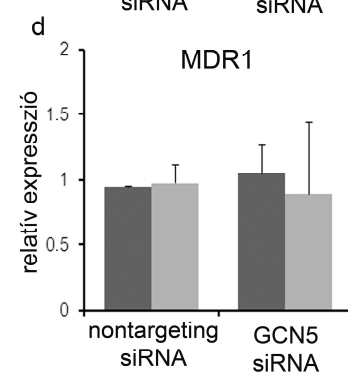
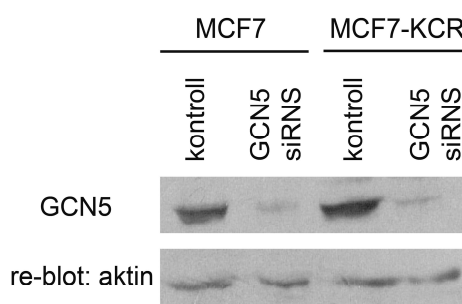
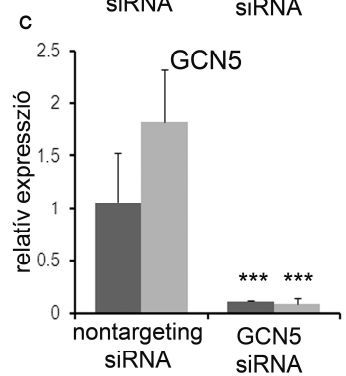
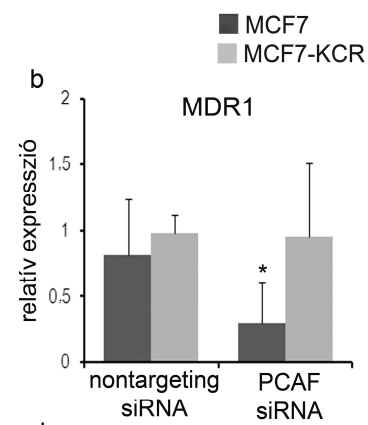
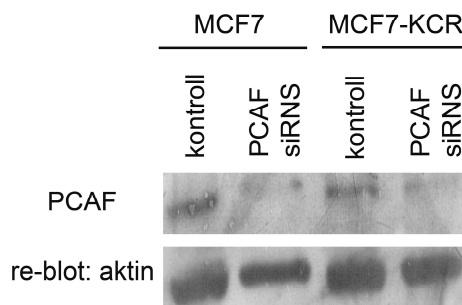
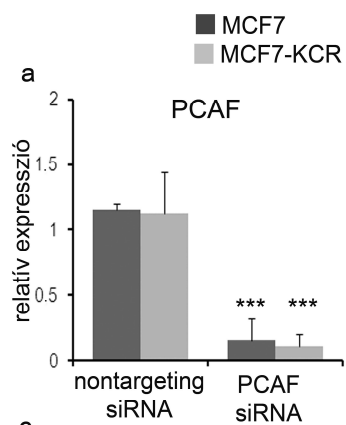
Korábban kimutatták, hogy az MDR1 gén kifejeződésének szabályozásában részt vesz a PCAF hiszton acetiltranszferáz, ezért kíváncsiak voltunk arra, a PCAF működése hozzájárul-e a drogrezisztens sejtek magas szintű MDR1 átíródásához. A gén és homológja, a GCN5 mRNS és fehérje szintű kifejeződését a sejtvonalakban összehasonlítva azt találtuk, hogy a drogrezisztens sejtekben a PCAF kis mértékben csökkent aktivitását a GCN5 kifejeződésének emelkedett szintje kompenzálja (15. és 16. a, c ábrák, jobb oldal, 1. és 3. oszlop).



15. ábra. Hiszton acetiltranszferázok expressziós szintjének vizsgálata MCF7 és MCF7-KCR sejtvonalakban. A PCAF, GCN5 és p300 gének mRNS szintjét RT-QPCR-rel vizsgáltuk. Az ábrán a 18S rRNS endogén kontrollhoz való normalizálás utáni, MCF7 sejtekben mért értékekhez viszonyított relatív expresszió van feltüntetve. A grafikon y tengelye logaritmikus beosztású. * jelöli az MCF7-KCR sejtvonal MCF7 sejtektől szignifikánsan eltérő értékeit.

Hogy megállapíthassuk a PCAF szerepét az MDR1 transzkripciójában, specifikus siRNS transzfekcióval gátoltuk a PCAF kifejeződését. A siRNS-kezelés hatására mindkét sejtvonalban lecsökkent a PCAF mRNS és fehérje mennyisége (16. a ábra). Ezzel párhuzamosan az MCF7 sejtekben a kontroll mintához képest 75 %-kal kevesebb MDR1 transzkriptum képződött, míg az MCF-KCR sejtekben nem történt változás az MDR1 mRNS szintjében (16. b ábra). Vizsgáltuk a PCAF hiszton acetiltranszferázzal nagy homológiát mutató GCN5 specifikus siRNS kezelés következményeit is. A siRNS transzfekció hatására mindkét sejtvonalban eredményesen lecsökkent a GCN5 mRNS és fehérje mennyisége (16. c ábra), de ez nem okozott változást az MDR1 transzkripciójában egyik esetben sem (16. d ábra). Az ADA2B (transcriptional adaptor 2B) HAT-komplex alegység hiányában a PCAF vagy GCN5 tartalmú SAGA hiszton acetiltranszferáz komplexek nem működőképesek (Nagy, Riss et al. 2010). Az ADA2B sikeres csendesítése (16. e ábra) az MCF7 sejtekben 50 %-os MDR1 mRNS-szint esést eredményezett, de az MCF7-KCR sejtekben nem változtatta meg a vizsgált gén kifejeződését (16. f ábra). A homológ HAT fehérjék egyidejű csendesítése nemcsak az MCF7 sejtekben, hanem az MCF7-KCR sejtekben is az MDR1 transzkriptum mennyiségének csökkenését eredményezte (16. g és h ábrák).

A siRNS kiváltotta géncsendesítési kísérletek arra utalnak, hogy az MDR1 alapexpressziójában szabályozó szerepe van az ADA2B tartalmú PCAF HAT komplexnek. Ez egy újabb példát mutat arra, hogy az egymással közeli rokon GCN5 és PCAF enzimtartalmú komplexek eltérő célgéneket szabályoznak. A drogrezisztens sejtek magas MDR1 mRNS szintjének csökkenése csak a GCN5 és PCAF egyidejű gátlásával érhető el, mely azt mutatja, hogy a homológ HAT-ok egymást helyettesítve képesek a magas MDR1 mRNS mennyiség fenntartására.



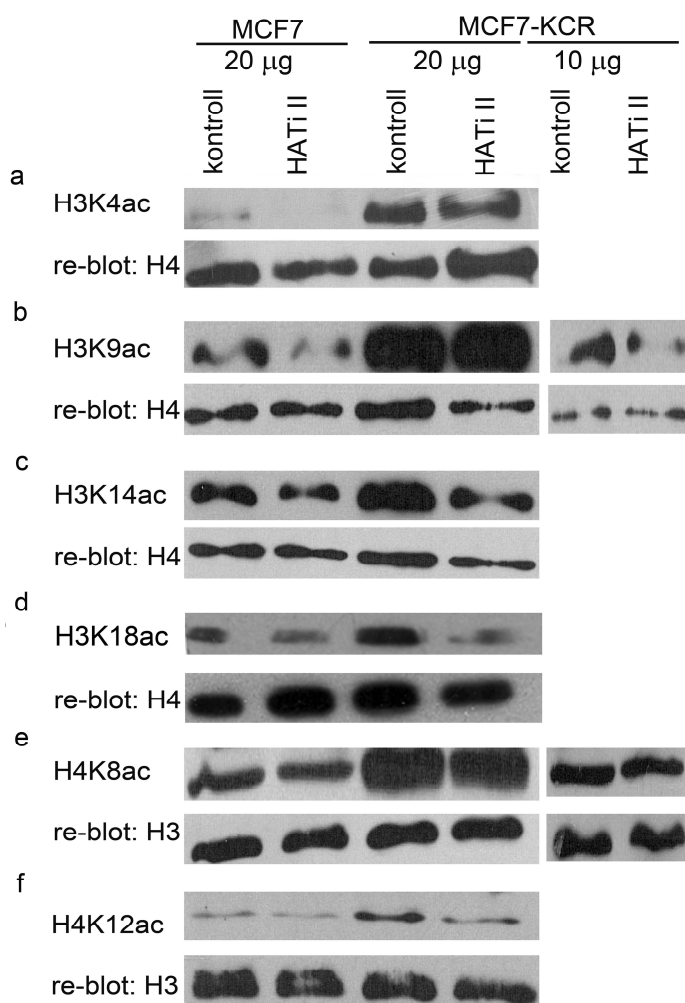
16. ábra. Egyes SAGA típusú hiszton acetiltranszferáz komplex alegységek siRNS alapú csendesítésének hatása az MDR1 expresszióra. a, c, e, g, Az MCF7 (sötétszürke) és MCF7-KCR (világosszürke) sejteket negatív kontroll (nontargeting) illetve PCAF (a), GCN5 (c), ADA2B (e) valamint PCAF és GCN5 (g) specifikus siRNS oligonukleotidokkal transzfektáltuk, majd 48 h után vizsgáltuk a PCAF, GCN5, Ada2b (a, c, e bal oldal és g ábra) mRNA szintjét a nem transzfektált és transzfektált mintákban. A relatív génexpressziót a GAPDH mRNA szinthez való normalizálás után, a nem transzfektált mintákhoz viszonyítva határoztuk meg. * jelöli a kezelt minták kontrolltól szignifikánsan eltérő értékeit. A transzfekció hatását a specifikus fehérje kifejeződésére a 48 órás siRNS kezelést követő 24 óra elteltével Western blot kísérletben vizsgáltuk (a, c, e jobb oldal). Belső kontrollként ugyanazon a membránon az aktin mennyiségét vizsgáltuk. **b, d, f, h,** Az MCF7 (sötétszürke) és MCF7-KCR (világosszürke) sejteket negatív kontroll (nontargeting) illetve PCAF (b), GCN5 (d), ADA2B (f) valamint PCAF és GCN5 specifikus siRNS oligonukleotidokkal transzfektáltuk, majd 48 h után vizsgáltuk az MDR1 mRNA szintjét a nem transzfektált és transzfektált mintákban, a fentebb leírtakkal megegyező módon.

5.6 p300 hiszton acetiltranszferáz gátlásának génexpresszióra és a hiszton acetiláltságra kifejtett hatása eltérő a vizsgált sejtvonalakban.

Az újabb irodalmi adatok alapján a PCAF mellett a p300 hiszton acetiltranszferáznak is szabályozó szerepe van az MDR1 transzkripciójában. Annak vizsgálatára, hogy ez a HAT részt vesz-e az MDR1 gén átírásának szabályozásában az általunk vizsgált sejtvonalakban, egy nemrégiben leírt vegyülettel, a HATi II-vel gátoltuk a p300 működését. A gén kifejeződésének mértéke nem változott meg a drog rezisztencia kialakulása során (15. ábra). A HATi II vegyületről *in vitro* acetilációs kísérletekben kimutatták, hogy 5 μ M-os koncentrációban a p300 enzimaktivitását 50 %-kal, a GCN5 működését 30 %-kal gátolja, míg a PCAF HAT aktivitását nem befolyásolja, a CBP-re kifejtett hatását pedig nem vizsgálták. (Costi, Di Santo et al. 2007). Leírták, hogy

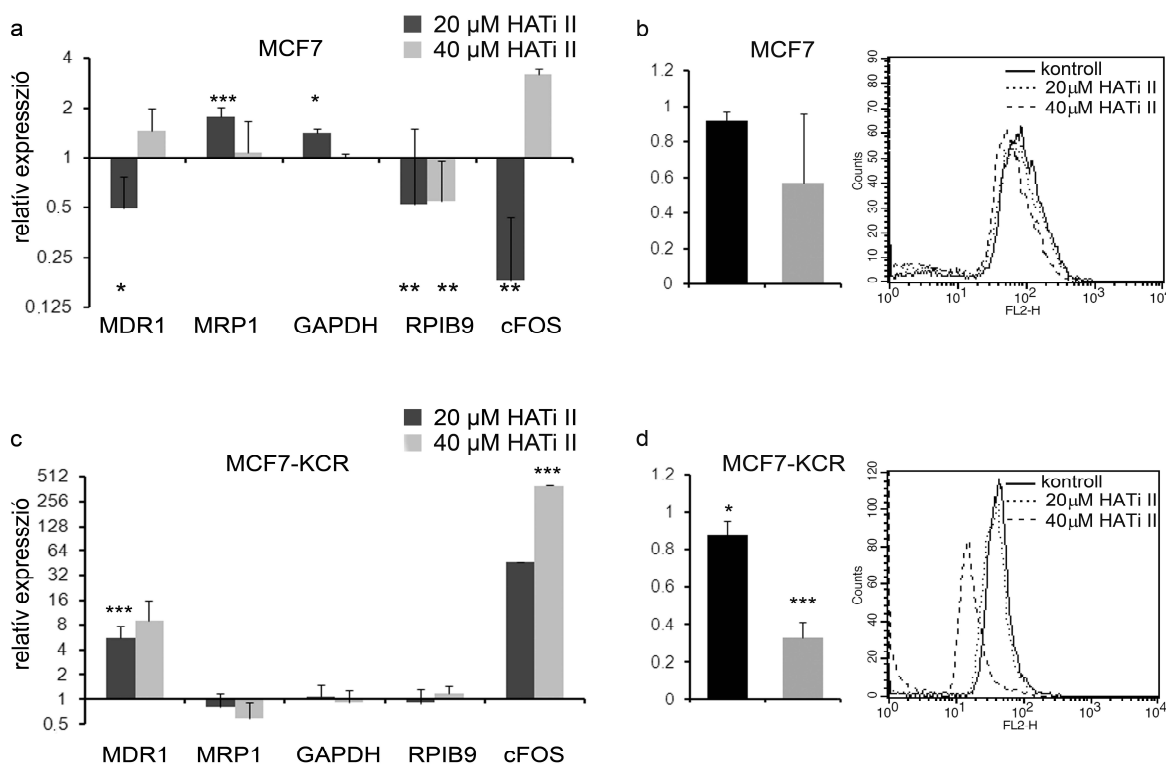
20 μM -os koncentráció felett HeLa sejtekben csökkenti a H3 hiszton acetiláltságát és kromatin kondenzációt vált ki.

A HAT inhibitorral való kezelés genomi szintű hiszton acetilációra kifejtett hatását immunoblottal vizsgáltuk (17. ábra). A specifikusan a p300 által acetilált H3K18 lizin mennyisége az enzim gátló kezelés hatására mindkét sejtvonalban csökkent (17. d ábra). Az MCF7 sejtekben a H3K4 és H3K9 lizinek acetiláltsága nagymértékben, a H3K14, H4K8 és H4K12 acetil lizinek szintje kisebb mértékben csökkent a HATi II gátlószer hatására. Az MCF7-KCR sejtekben az esetleges változás kimutatásához a túltelített jelek esetében 20 μg helyett 10 μg fehérje kivonatot használtunk a Western blot kísérletekben (17. b, és e, ábrák). Ebben a sejtvonalban a HATi II gátló hatásának következtében jelentősen kevesebb acetilált H3K9, H3K14 és H4K12 lizint mutattuk ki. Míg az acetilált H3K4 szintje csak kisebb mértékben csökkent, addig a H4K8 acetiláltságának mértéke nem változott. Összefoglalva, azt találtuk, hogy egyes specifikus H3 és H4 lizin oldalláncok acetiláltsági szintje egyik vagy mindkét sejtvonalban lecsökkent a HAT gátlás hatására. Az eredmények alapján egyrészt a drog hatékonyan működik mindkét sejtvonalban, másrészt a sejtvonalak HATi II kezelésre adott eltérő válasza ismét alátámasztja, hogy a drogérzékeny és drogrezisztens sejtekben különbözik a hiszton acetiláció szabályozása.



17. ábra. A specifikus hiszton acetiláltság genomi szintű vizsgálata kontroll és HATi II kezelt MCF7 és MCF7-KCR sejtekben. A 24 óráig DMSO-val álkezelt és 20 µM HATi II gátlószerrel kezelt MCF7 és MCF7-KCR sejtekből hiszton kivonatot készítettünk, majd 20-20 µg fehérjeminta (1-4. oszlop) és acetil H3K4 (a), acetil H3K9 (b), acetil H3K14 (c), acetil H3K18 (d), acetil H4K8 (e) és acetil H4K12 (f) ellenanyagok felhasználásával Western blot kísérletet végeztünk. Belső kontrollként ugyanazon a membránon a módosítatlan H3 ill. H4 hiszton mennyiségét vizsgáltuk. Az MCF7-KCR sejtvonalban a túltelített jelek miatt az acetil H3K9 és acetil H4K8 specifikus kísérletet elvégeztük 10-10 µg hiszton kivonat felhasználásával is (b, e 5-6. oszlop).

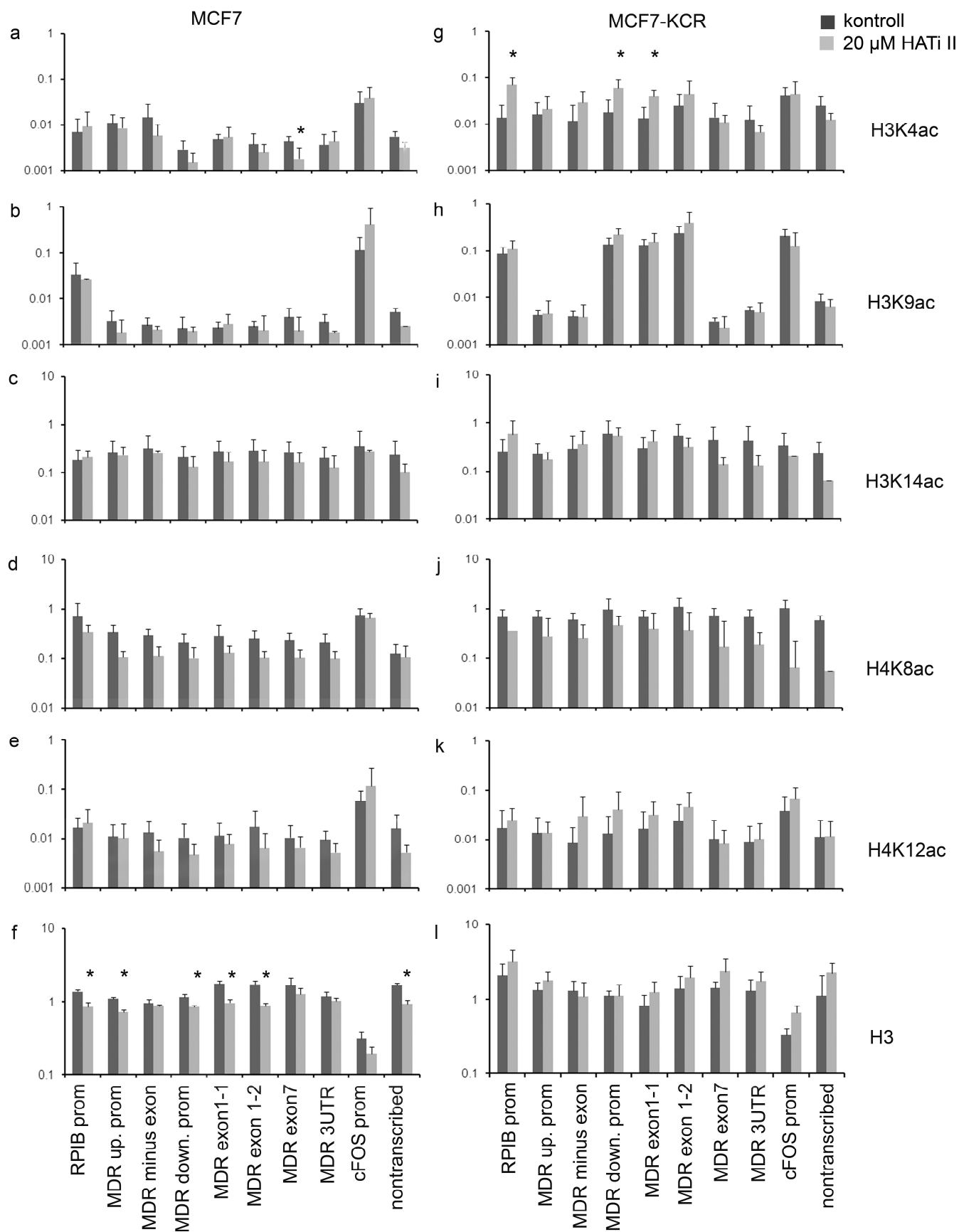
Ezt követően tanulmányoztuk a 24 órás HATi II kezelés hatását a génexpresszióra és a hiszton acetiláltságra az MDR1 kromatinjában. Az MCF7 sejtekben az MDR1 mRNS szintje kis mértékben csökkent (18. a ábra). A többi vizsgált gén transzkripciója nem változott vagy csökkent, az MRP1 gén kivételével, amelynek az expressziója enyhén emelkedett. A drog akkumuláció vizsgálata alapján a doxorubicin intracelluláris koncentrációja nem különbözött a kezeletlen és HATi II kezelt MCF7 sejtekben (18. b ábra). A doxorubicin érzékeny sejtvonallal szemben a doxorubicin rezisztens sejtvonalban a HATi II koncentráció emelésével fokozatosan magasabb MDR1 és cFOS mRNS szintet mértünk (18. c ábra). Az MDR1 gén kifejeződése egy nagyságrenddel, a cFOS gén kifejeződése két nagyságrenddel nőtt meg a kezelés következtében az MCF7-KCR sejtekben. Egyéb jelentős génexpresszió változás nem volt kimutatható. A HAT gátló kezelés hatására csökkenő intracelluláris doxorubicin mennyiség arra utal, hogy az MDR1 mRNS szint mellett az erről képződött fehérje mennyisége is megemelkedett (18. d ábra).



18. ábra. A HATi II kezelés hatása a génexpresszióra és a drog akkumulációra. a, c, MCF7 (a) és MCF7-KCR (c) sejtek 24 órás kontroll (DMSO), 20 μ M (sötétszürke) és 40 μ M (halványszürke) koncentrációjú HATi

II kezelése után a feltüntetett gének mRNA szintjét vizsgáltuk RT-QPCR-rel. Az ábrán a 18S rRNS endogén kontrollhoz való normalizálás utáni, álkezelt kontrollhoz viszonyított relatív expresszió szerepel. * jelöli a kezelt minták kontrolltól szignifikánsan eltérő értékeit. **b, d**, MCF7 (b) és MCF7-KCR (d) sejtek 24 órás kontroll (DMSO), 20 μ M (sötétszürke) és 40 μ M (halványszürke) koncentrációjú HATi II kezelése után FACS analízissel vizsgáltuk a doxorubicin akkumuláció mértékét. A bal oldali grafikonon a 3 független kísérletből számolt, a kontroll mintához viszonyított relatív fluoreszcencia intenzitás értékeinek átlaga szerepel. A jobb oldali ábrákon egy-egy reprezentatív mérés eredménye látható.

A HATi II hatását az MDR1 gén szintjén ChIP módszerrel vizsgáltuk. Az acetilált H3K4 lizin mennyisége a drogérzékeny sejtvonalban nem mutat jelentős változást, azonban a drogrezisztens sejt specifikus régióiban megemelkedett a HAT-gátló kezelés következtében (19. a, és g, ábrák). A kezelt MCF7-KCR sejtekben a vizsgált módosítás mértéke szignifikánsan magasabb az RPIB9 promótere mellett az MDR1 downstream promóter, és az azt követő első exon régiójában, mint a kontroll mintában. Az acetil H3K9, H3K14, H4K8 és H4K12 lizinek szintjében nem tapasztaltunk nagymértékű eltérést a HATi II kezelés hatására egyik sejtvonalban sem (19. b,-f, és 19. h,-l, ábrák). Tehát a HAT-ok gátló kezelésekor az egyes módosítások globális mennyiségében tapasztalt csökkenés az MDR1 és a kontrollként vizsgált gének kromatinjában nem mutatható ki. A drogrezisztens sejtvonalban a HATi II kezelés kiváltotta MDR1 mRNA szintemelkedéssel párhuzamosan megnő az acetil H3K4 lizin mennyisége. Ettől eltérő a cFOS gén transzkripciójának indukciója, mert a transzkripció aktiválódásával egyidejűleg jelentős változás nem figyelhető meg a gén promóterének acetiláltságában.



19. ábra. Az MDR1 gén meghatározott régióinak hiszton acetilációs mintázata kezeletlen és HATi II kezelt mintákban. Kezeletlen (sötétszürke) és HATi II kezelt (világosszürke) MCF7 (bal oldal) és MCF-KCR (jobb oldal) sejtekkel, H3K4ac (a, g), H3K9 (b, h), H3K14 (c, i), H4K8 (d, j), H4K12 (e, k) és H3 (f, l) ellenanyagok felhasználásával kromatin immunprecipitációt végeztünk. A precipitált DNS mennyiségét kvitatív PCR reakcióban határoztuk meg, majd az input kromatin százalékaként kifejezve tüntettük fel. Az ábrán 2 -5 független kísérletből számolt átlag és szórás szerepel, * jelöli a HATi II kezelt sejtek azon értékeit, amelyek szignifikánsan eltérnek a kezeletlen sejtekben mért értékektől.

6. Diszkusszió

Az MDR1 gén amplifikációjának és megnövekedett kifejeződésének szerepe a magas mRNS szint kialakításában.

Az általunk vizsgált MCF7-KCR drogrezisztens sejtvonalban genetikai és epigenetikai változások is hozzájárulnak az **MDR1 gén magas szintű kifejeződéséhez**, ahogy azt más sejtvonalakban is kimutatták (Chen, Wang et al. 2005). Egyrészt a gén amplifikálódásával több kópiáról történik transzkripció. Másrészt a magas MDR1 promóter aktivitásra utal az mRNS mennyiségének öt nagyságrendbeli megemelkedése, a gén egy nagyságrendbeli kópiaszám növekedése mellett. Az aktív génátírást a gén kromatinjában történt epigenetikai változás, a specifikus acetil lizin módosítások magas szintje kíséri. Hasonló mértékű, a gyógyszerérzékeny sejtvonalhoz képest 6 nagyságrenddel magasabb MDR1 mRNS szintet mutattak ki abban a rezisztens sejtvonalban, ahol a transzkripció aktiválódása mellett génamplifikáció is történt (Raguz, Tamburo De Bella et al. 2004). Több vizsgálat alapján a kemoterápiás kezelés az MDR1 gén kifejeződését poszttranszkripciósan is szabályozhatja (Yague, Armesilla et al. 2003; Zhu, Wu et al. 2008), azonban az általunk vizsgált MCF-KCR sejtvonalban a PgP kifejeződését az mRNS stabilitásának módosulása nem befolyásolja.

Az MDR1 upstream transzkripció tanulmányozásával egyidejűleg megfigyelték, hogy a máig nem tisztázott funkciójú **RPIB9 gén expressziója** aktiválódik emlőtumoros sejtekben (Chen, Wang et al. 2005; Raguz, De Bella et al. 2005). A génátírás aktivitása korrelál a tumor metasztázis képző képességével. Kísérleteinkben oszteoszarkóma illetve drogérzékeny és -rezisztens emlőkarcinóma sejtvonalakban vizsgáltuk az RPIB9 mRNS szintjét. Azt találtuk, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően az emlőtumor eredetű sejtvonalakban aktív génátírás történik. A drogrezisztens sejtekben tovább indukálódik a gén transzkripciója a drogérzékeny sejtekhez képest, azaz a génműködés aktivitása az általunk vizsgált sejtvonalakban korrelál a drog rezisztencia mértékével.

Az aktív MDR1 génműködéshez epigenetikai változások járulnak hozzá.

Számos adat mutatja, hogy a drogrezisztens sejtekben az MDR1 gén kifejeződésének a szabályozása megváltozhat a transzkripciós faktorok eltérő működése

következtében (Scotto 2003). Emellett vagy ennek következtében a génkifejeződés epigenetikai szabályozása is módosulhat a drogkezelés alatt. Kísérleteink célja az alapszintű illetve megemelkedett MDR1 kifejeződés epigenetikai szabályozásának, ezen belül a hiszton acetiláció tanulmányozása volt. Emellett összehasonlítottuk az acetil lizinek genomi szintjét a gyógyszerérzékeny és -rezisztens sejtvonalakban.

A **globális specifikus hiszton acetiláció** mértékét vizsgálva azt találtuk, hogy a doxorubicin rezisztenciát mutató sejtekben az acetil H3K4, H3K9, H3K14, H4K8 és H4K12 módosítás szintje különböző mértékben, de megemelkedett a doxorubicin érzékeny sejtekhez képest. A drogérzékeny sejtekkel szemben hiszton deacetiláz gátló kezelésre a vizsgált lizinek acetilációjának mértéke tovább nem növelhető, melynek az állhat a háttérben, hogy már a kezeletlen MCF7-KCR sejtek kromatinjában nagy arányú a lizinek acetiláltsága. Egyes acetil lizinek magas szintje specifikus hiszton acetiltranszferáz gátló kezeléssel lecsökkenthető. A gyógyszerrezisztens sejtekben a genomi szintű hiszton acetiláció mértékének változását más sejtvonalakban is megfigyelték, azonban az irodalmi adatok nem egyértelműek. Az MDR1 gént magas szinten kifejező drogrezisztens petefészek adenokarcinóma sejtvonalban genomi szinten megemelkedett az acetil H4 módosítás mennyisége a drogérzékenyhez képest (Yatouji, El-Khoury et al. 2007). Ezzel ellentétben a különböző MDR1 génaktivitású, gyógyszerérzékeny és -rezisztens kissejtes tüdőkarcinóma sejtvonalak genomi szintű H3 és H4 acetilációs szintje nem mutat eltérést (El-Khoury, Breuzard et al. 2007). Eredményeinkkel szemben, két különböző hatásmechanizmusú kemoterápiás szer, a doxorubicin és a cisplastin indukálta multidrog rezisztens MCF7 sejtekben egyaránt kis mértékben lecsökkent a genomi szintű H3K9ac módosítás mértéke (Chekhun, Lukyanova et al. 2007). Az egymásnak ellentmondó megállapítások miatt a többszörös gyógyszerrezisztenciát kísérő hiszton acetiláció genomi eloszlásának és mennyiségének megállapítására több, különböző típusú tumorból származó drogérzékeny és MDR fenotípusú sejt vizsgálatára lenne szükség. A gyógyszerérzékeny és -rezisztens sejtekkel szemben, részletesebben ismert az egyes tumorokból származó szövetminták és daganatos sejtvonalak genomi szintű hiszton acetilációs szintjének jellemző irányú megváltozása a normál működésű sejtekhez képest (Fraga, Ballestar et al. 2005; Seligson, Horvath et al. 2005; Barlesi, Giaccone et al. 2007; Park, Jin et al. 2008; Elsheikh, Green et al. 2009; Liu, Cheng et al. 2010; Manuyakorn, Paulus et al. 2010). Az

adatok azt mutatják, hogy tumor típusától függően változik meg a hiszton acetiláció kialakulásának szabályozása.

Az **MDR1 gén** epigenetikus szabályozását vizsgáló korábbi kísérletekben csak a gén promóter régióit, illetve a downstream promótert követő 5' átíródo génszakasz kromatinjának **hiszton acetilációs módosítási szintjét** vizsgálták. Emellett az eddigi irodalmi adatok specifikus acetil lizin ellenanyagok hiányában csak az általánosan acetilált H3 és H4 hisztonok mennyiségére vonatkoztak. Több tanulmányban leírták, hogy az általunk vizsgált sejtvonalakhoz hasonlóan, az MDR1 gént aktívan expresszáló drogrezisztens sejtvonalakban magasabb az acetil H3 és/ vagy H4 hisztonok szintje a gén promóter régiójában, mint a drogérzékeny sejtvonalakban, ahol az MDR1 transzkripcióan inaktív (Chen, Wang et al. 2005; El-Khoury, Breuzard et al. 2007; Yatouji, El-Khoury et al. 2007; Jin, Liu et al. 2009). Olyan drog érzékeny sejtvonalakat összehasonlítva, amelyekben drog indukció hatására az MDR1 gén nem, alacsony ill. közepes mértékben expresszálódik, azt találták, hogy a gén transzkripció aktivitása korrelál a promóter és a 5' átíródo génszakasz H3 hiszton acetilációs szintjével (Baker, Johnstone et al. 2005). Ha az MDR1 transzkripció az upstream promótertől iniciálódik, nem a downstream, hanem az attól 5' irányban lévő promóter régió hiszton acetiláltsági szintje emelkedik meg (Chen, Wang et al. 2005). Az általunk vizsgált drogrezisztens MCF7-KCR sejtvonalban az alacsony acetil lizin módosítási szint az MDR1 upstream promóter és az azt követő első exon kromatin régiójában korrelál az innen átíródo transzkriptum hiányával.

A hiszton acetiláció genomi eloszlásának vizsgálata alapján Wang és munkatársai megállapították, hogy a hisztonok acetilációs módosítása pozitívan korrelál a génextpresszióval (Wang, Zang et al. 2008). Míg egyes acetil lizin módosítások, például a H3K9 lizin acetilációja az aktívan átíródo gének transzkripció start helyére jellemzőek, addig más acetil lizinek, például a H3K4ac, H3K14ac, H4K8ac és H4K12ac, az aktívan expresszálódo gének promótere mellett a kódoló régióban is megtalálhatóak. Az MDR1 gént alacsony illetve magas szinten átíró MCF7 és MCF7-KCR sejtvonalakban az említett acetil lizinek mennyiségét és azok eloszlását a vizsgált gén kromatinjában összehasonlítva ennek megfelelő eredményeket kaptunk a **H3K4** és **H3K9** lizinek esetében. Az acetil **H4K8** lizin módosítás mértéke a promóter régiójában nem, csak az átíródo exonok régiójában magasabb az MDR1 transzkripció aktivitást mutató sejtvonalban. A **H3K14** és **H4K12** lizinek acetilációs szintje az MDR1 gén kromatinjában nem mutat különbséget

gyenge vagy erős génexpresszió esetén. A transzkripciósan aktív cFOS gén promóter régiójában átlagosan háromszor magasabb az acetil H4K12 módosítás szintje mindkét sejtvonalban, mint az MDR1 gén vizsgált kromatin szakaszain. Az acetil H3K14 lizin egyformán magas mennyiségben van jelen a különböző expressziós szintű gének vizsgált régióiban mindkét sejtvonalban. Ezek az adatok utalhatnak az acetil H4K12 specifikus ellenanyag alacsony hatékonyságára, illetve az anti-acetil H3K14 ellenanyag nem specifikus működésére is.

Az MCF7-KCR sejtekben az **RPIB9** magasabb expressziós aktivitásával egyidejűleg a gén promóterében az MCF7 sejtekhez viszonyítva szignifikánsan több acetilált H3K9 mutatható ki. Az MCF7 és MCF7-KCR sejtekben egyformán magas expressziós szintű a ChIP kísérletekben pozitív kontrollként használt **cFOS** (nem ábrázolt adat). Az MCF7 sejtekben a cFOS promóter kromatinjában az acetil H4K8 lizin módosítás az intergenikus szakaszhoz viszonyított szignifikánsan magasabb szintje korrelál az aktív transzkripcióval. A hasonlóan aktív génműködésre az MCF7-KCR sejtvonalban az acetil H3K9 lizin negatív kontroll régióhoz viszonyított szignifikáns emelkedése utal.

A kromatin immunprecipitációs kísérletek eredményei alapján a drogrezisztens sejtekben a magas expressziós szintű MDR1, RPIB9 és cFOS gének promóterében különböző mértékben, de megemelkedett az **acetil H3K9 lizin módosítás** szintje az át nem íródó génszakaszhoz képest. Ennek a hiszton módosításnak szerepe lehet a gének transzkripció aktiválásában illetve a transzkripciósan aktív kromatin szerkezet fenntartásában. A H3K18 és H3K27 lizinek acetilálódásával ellentétben, az acetil H3K9 módosítás jelenléte nem esszenciális a PPAR δ magi receptor aktiválta génaktiváláshoz, de szintje a transzkripció aktivitással korrelál (Jin, Yu et al. 2011). Mások azt találták, hogy a GCN5/PCAF tartalmú HAT komplexek hiányában lecsökken az acetil H3K9 lizin szintje, és ezzel egyidőben specifikusan az ATAC működésképtelensége esetén lecsökken az azonnali korai gének stressz kiváltotta indukciójának mértéke (Nagy, Riss et al. 2010). Ezek az adatok a H3K9 lizin módosításának géncsoportonként eltérő szerepére utalnak.

A **H3K4 lizin acetilálódását** először 2007-ben mutatták ki, majd Wang és munkatársai írták le, hogy a módosítás nagyobb mértékben van jelen a transzkripcióban aktív gének kromatinjában (Wang, Zang et al. 2008). Eredményeink alátámasztják megfigyeléseiket, mert a magas MDR1 transzkripció aktivitású sejtvonalban a gén promóter régiójában és az átíródó génszakaszok kromatinjában emelkedett az acetil H3K4

lizin mennyisége. A H3K4 lizin acetilációs módosításával szemben már korábban ismert volt, hogy a gének 5' átíródo szakaszában az említett lizin trimetilációjának szintje korrelációt mutat a gén transzkripció aktivitásával, az RNS polimeráz II jelenlétével és az általános hiszton acetiláció mértékével (Huo, Magro et al. 2010). Emellett leírták, hogy a H3 hiszton acetiláció elősegíti a H3K4 lizin metilációját (Nightingale, Gendreizig et al. 2007). Kísérleteinkben a metilált lizinek előfordulását nem vizsgáltuk, de valószínű, hogy a magas MDR1 expressziójú MCF7-KCR sejtekben a vizsgált gén kromatinjában a H3K4 lizin acetilációja mellett metilálódása is emelkedett mértékű.

Hiszton deacetiláz gátlás hatása eltérő a drogérzékeny és -rezisztens sejtvonalakban.

Az elmúlt években jelentősen tanulmányozott területté váltak a HDAC enzimek gátlásán (HDACi) alapuló lehetséges tumorelles módszerek. A HDAC inhibitorok számos mechanizmus révén képesek gátolni a tumoros sejt működését. Azonban több kísérletes bizonyíték azt mutatja, hogy a kifejtett kedvező hatásuk mellett gyógyszerrezisztens daganatsejtek kialakulásához járulhatnak hozzá. Többen tanulmányozták a **HDAC gátlás MDR1 expresszióra kifejtett hatását**. Drogérzékeny sejtvonalakban trichostatin A ill. depsipeptide HDAC inhibitor kezelésnek kitett sejtekben emelkedett az MDR1 mRNS mennyisége (Jin and Scotto 1998; Baker, Johnstone et al. 2005; Tabe, Konopleva et al. 2006; Yamada, Arakawa et al. 2006; Yatouji, El-Khoury et al. 2007; Kim, Kim et al. 2009; Huo, Magro et al. 2010). Akut mieloid leukémiás sejtvonalakban HDACi kezelésre (phenylbutyrate, valporate, suberolyanilide acid, trichostatin A) az MDR1 gén mellett egyéb ABC transzporterek indukcióját is leírták (ABCG2/BCRP, ABCC10/MRP7, ABCC11/MRP8) (Hauswald, Duque-Afonso et al. 2009). Kísérleteinkben az irodalmi adatokkal megegyezően a TSA kezelés a doxorubicin érzékeny MCF7 sejtekben indukálta az MDR1 fehérje kifejeződését. Ezzel szemben a doxorubicin rezisztenciát mutató magas MDR1 expressziójú MCF7-KCR sejtekre nem volt hatása a TSA kiváltotta HDAC gátlásnak. Több esetben a **drogrezisztens sejtekben** is indukálódott az MDR1 expressziója HDAC gátló kezelésre (El-Osta, Kantharidis et al. 2002; Tabe, Konopleva et al. 2006). Ezzel ellentétben a HDAC inhibíció az ABCB1 gén transzkripció csökkenését váltotta ki rágsáló drogrezisztens sejtvonalban (Castro-Galache, Ferragut et al. 2003), doxorubicin rezisztens MCF7 sejtekben (Tian, Jurukovski et al. 2005) és kissejtes tüdőkarcinómából származó drogrezisztens sejtekben (El-Khoury,

Breuzard et al. 2007). Az MCF7 és MCF7-KCR sejtvonalakkal kapott eredményekhez hasonlóan a petefészek adenokarcinóma eredetű drogrezisztens OV1/VCR sejtekben a TSA kezelés nem változtatta meg az MDR1 expressziót, annak ellenére, hogy drogérzékeny sejtekben MDR1 mRNS növekedést váltott ki (Yatouji, El-Khoury et al. 2007). Tehát több irodalmi adat alapján a TSA az MDR1 expresszióra eltérő hatást fejthet ki drogérzékeny és -rezisztens sejtekben. A vizsgálatok szerint a HDAC gátlás a PgP kifejeződést a transzkripció szintjén befolyásolja (El-Khoury, Breuzard et al. 2007). Mivel a transzkripciós faktorok kötődésének változása és a kromatin szerkezet módosulása együttesen vezet a transzkripció aktiválódásához, a drogrezisztencia kialakulásával megváltozó hiszton acetilációs szabályozás hozzájárulhat ahhoz, hogy a vizsgált sejtvonalakban a HDAC gátlás eltérő hatást fejt ki.

Többen tanulmányozták a hiszton deacetiláz gátlás genomi szintű hiszton acetilációra kifejtett hatását, azonban eredményeink, melyek szerint az MCF7-KCR sejtekkel ellentétben az MCF7 sejtekben a **specifikus acetil lizinek globális mennyisége** növelhető, és az irodalmi adatok ellentmondásosak. Petefészek adenokarcinóma sejtvonalakban az acetil H4 (Yatouji, El-Khoury et al. 2007), kissejtes tüdőkarcinóma sejtvonalakban az acetil H3 és H4 globális mennyiségét vizsgálták TSA kezelést követően (El-Khoury, Breuzard et al. 2007). Mindkét esetben a gyógyszerérzékeny és -rezisztens sejtvonalakban is megemelkedett az acetil lizin szint. Nem mutatható ki összefüggés a TSA kezelésre mutatott globális acetilációs szint és az MDR1 expresszió mértékének változása között, mert a drog rezisztens sejtvonalak genomi szintű hiszton acetiláció mértékének emelkedésével egyidejűleg az MDR1 gén kifejeződésének szintje csökkent (El-Khoury, Breuzard et al. 2007), ill. változatlan maradt (Yatouji, El-Khoury et al. 2007).

A HDACi kezelés következtében nő az **MDR1** promóter **régióban** az acetil H3 (El-Osta, Kantharidis et al. 2002; David, Yegnasubramanian et al. 2004; Baker, Johnstone et al. 2005; Chen, Wang et al. 2005; Kim, Kim et al. 2009) illetve az acetil H4 módosított hisztonok mennyisége (El-Osta, Kantharidis et al. 2002; David, Yegnasubramanian et al. 2004; Yatouji, El-Khoury et al. 2007). Kísérleteinkben az MCF7 sejtekben a TSA MDR1 génátírást indukált, melyet specifikusan az acetil H3K4 és H3K9 lizinek mennyiségének emelkedése kísért, az átírt géntest kromatinjában illetve a gén promóter régióiban és azokat követő első exonokban. Jelentősen sem a H4K8, sem a H4K12 lizinek acetiláltságának mértéke nem változott. A vizsgált régióban megfigyelték a hisztonok hiperacetiláltságát az

MDR1 indukciót nem mutató illetve csökkenő MDR1 expressziót mutató sejtvonalban is (El-Osta, Kantharidis et al. 2002; David, Yegnasubramanian et al. 2004; El-Khoury, Breuzard et al. 2007; Yatouji, El-Khoury et al. 2007). Azaz, a hiszton acetiláció egyes esetekben nem elégséges az MDR1 expresszió aktiválásához és más gének esetében is megfigyelték, hogy a transzkripció iniciációjához további aktiváló faktorok szükségesek (Wang, Zang et al. 2009; Nagy, Riss et al. 2010). Az irodalmi adatokkal megegyezően, a HDACi hatására MDR1 expresszióváltozást nem mutató MCF7-KCR sejtekben is történt hiszton acetilációs szint növekedés: valamennyi vizsgált MDR1 specifikus régióban több acetil H4K12 lizin volt kimutatható a TSA kezelést követően.

A HDAC gátlás következtében az MCF7 és MCF7-KCR sejtekben is kis mértékben indukálódott az MDR1 mellett a **cFOS** gén expressziója. Mindkét sejtvonalban csak a magasabb koncentrációjú TSA kezelésnek volt szignifikáns hatása a génkifejeződésére és az alacsonyabb koncentrációjú HDACi kezelést követően végzett kromatin immunprecipitáció során a cFOS gén promóterében nem mutatható ki változás az acetil lizinek szintjében. Az **RPIB9** gén expressziós változása hasonló képet mutat az MDR1 généhez. Azaz az MCF7 sejtben, ahol alapszinten kis mértékben expresszálódik a gén, TSA hatására indukciót mutat, amelyet promóter régiójában a H3K4 és H3K9 lizinek acetiláltsági szintjének növekedése kísér. A drogrezisztens sejtekben ahogy az MDR1, úgy az RPIB9 gén expressziója sem változik a megemelkedett acetil H4K12 szint ellenére.

Egyes HAT enzimek gátlásának következményei eltérőek a drogérzékeny és – rezisztens sejtvonalakban.

A hiszton deacetilázok gátlása mellett vizsgáltuk, hogy egyes **hiszton acetiltranszferázok hiányában** hogyan változik az **MDR1 gén expressziója**. Számos génhez több hiszton acetiltranszferáz kötődik, melyek funkciójukat kifejthetik egymással együttműködve, egymást követően vagy egymástól függetlenül (Wang, Zang et al. 2009). Így az MDR1 promóter régióval is több hiszton acetiltranszferáz, a p300, CBP és PCAF kölcsönhatását mutatták ki, melyek egymáshoz való viszonya nem ismert (El-Khoury, Breuzard et al. 2007; Jin, Liu et al. 2009; Kim, Kim et al. 2009; Sengupta, Mantha et al. 2011). Az általunk vizsgált drogérzékeny sejtvonal alapszintű MDR1 expressziója lecsökkent a **PCAF** HAT illetve az **ADA2b** HAT-komplex alegység specifikus lecsendesítésével. A PCAF enzimmel nagy homológiát mutató **GCN5** hiánya nem

befolyásolta az MCF7 sejtekben az MDR1 kifejeződését. Ez arra utal, hogy az MCF7 sejtekben a PCAF katalitikus alegységű SAGA komplexnek az alapszintű MDR1 transzkripcióban szabályozó szerepe van. További vizsgálatok szükségesek annak az igazolására, hogy az indukált MDR1 expresszióban is hasonlóan részt vesz a PCAF hiszton acetiltranszferáz, azonban erre utal a HDAC inhibíció kiváltotta mRNS átírást kísérő acetil H3K9 szint emelkedés a gén transzkripció start helyének kromatin régiójában. Eredményeink összefüggnek mások megfigyeléseivel, ami szerint a homológ HAT enzimek hasonló katalitikus aktivitásuk ellenére eltérő target géneket szabályozhatnak (Wang, Zang et al. 2009; Nagy, Riss et al. 2010). A drogérzékeny sejtekkel ellentétben, a drogrezisztens sejtvonal MDR1 mRNS szintje nem csökkent le a PCAF, az ADA2b vagy a GCN5 fehérjék hiányában. Ezzel összefüggésben mások is azt találták, hogy szemben a drogérzékeny sejtekkel, a drogrezisztens sejtekben a promóterhez kötött PCAF mennyisége nem korrelál a génátírás aktivitásával (El-Khoury, Breuzard et al. 2007). Ugyanakkor a két homológ enzim egyidejű gátlásával alacsonyabb MDR1 mRNS szintet mutattunk ki. Ez arra utal, hogy a drog rezisztens sejtekben a magas MDR1 mRNS mennyiség és ezzel egyidejűleg a H3K9 lizin megemelkedett acetilációs szintjének kialakításában és/vagy fenntartásában a PCAF illetve a GCN5 hiszton acetiltranszferázok együttesen vesznek részt. Ehhez hasonlóan, *in vivo* egér embrionális fibroblasztokban csak a GCN5/PCAF kettős deléciós mutánsokban csökkent le az acetil H3K9 módosítás mennyisége (Jin, Yu et al. 2011). Elképzelhető, hogy az említett HAT-ok mellett mások működése is szükséges az aktív génműködéshez. *In vitro* a H3K9 lizin a GCN5/PCAF tartalmú HAT komplexek elsődleges szubsztrátjai közé tartozik (Anamika, Krebs et al. 2010), de emellett a MYST családba tartozó TIP60 közepes, a p300 kisebb mértékben katalizálják a H3K9 lizin acetilációs módosítását (Schiltz, Mizzen et al. 1999; Anamika, Krebs et al. 2010). Emellett más hiszton acetilázok is részt vehetnek a módosítás kialakításában, mert *in vivo* a komplexben működő hiszton acetiltranszferázok szubsztrát specificitását befolyásolják a komplex alegységei, valamint kimutatták, hogy egyes HAT enzimek meghatározott helyhez kötődését a DNS-sel való kölcsönhatás is befolyásolja (Grant, Eberharder et al. 1999; Berndsen and Denu 2008).

Mivel az irodalmi adatok alapján az MDR1 alapszintű kifejeződésében a PCAF mellett a **p300** HAT is érintett, megvizsgáltuk a **HATi II kezelés** hatását a génexpresszióra, illetve a genomi és MDR1 gén szintű hiszton acetilációra. A nemrégiben

leírt HATi II vegyület 5 μ M-os koncentrációban *in vitro* vizsgálatban nagyobb mértékben a p300, kisebb mértékben a GCN5 működését gátolja. Kísérleteinkben a 20 μ M koncentrációjú HATi II kezelés hatására mindkét sejtvonalban lecsökkent a H3K9, H3K14, H3K18 és H4K12 lizinek **globális acetiláltsága**nak mértéke. Egér embrionális fibroblaszt sejtekben egyetlen HAT hiányában nem detektáltak genomi szintű acetil lizin szint változást, csak a homológ enzimpárok kettős delécioja esetén (Jin, Yu et al. 2011). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a HATi II kezelés *in vivo* a p300 mellett egyéb hiszton acetiltranszferázok működését is gátolja. Az acetil H4K8 szintje azonban annak ellenére nem változott, hogy a lizin a p300 *in vitro* elsődleges szubsztrátjai közé tartozik (Schiltz, Mizzen et al. 1999). A **drogérzékeny sejtekben** a kisebb koncentrációban alkalmazott HATi II szignifikánsan csökkentette az **MDR1 expressziót**. Ez a PCAF mellett a p300 transzkripció szabályozó szerepére utalhat az MCF7 sejtvonalban. A 40 μ M-os koncentrációban alkalmazott HATi II nem okozott változást az MDR1 gén kifejeződésében, ennek oka azonban nem ismert. A drogérzékeny sejtekben az **RPIB9** és a **cFOS** gének mRNS szintje szintén csökkent a 20 μ M-os koncentrációjú HATi II kezelés hatására. A gének vizsgált kromatin régióiban nem változott szignifikánsan a specifikus acetil lizinek mennyisége a genomi szinten tapasztalt csökkenés ellenére. A HATi II kifejezhető génexpresszió csökkentő hatását más specifikus acetil lizinek kialakulását gátolva vagy a vegyület által befolyásolt hiszton acetilázok más fehérjékkel való kölcsönhatásának módosulása alapján.

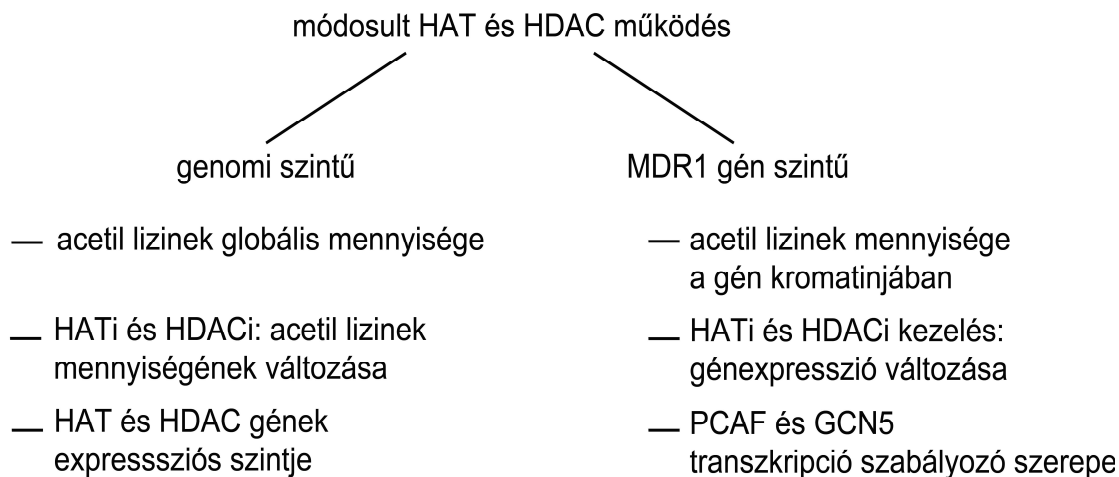
A **drogrezisztens sejtvonalban** a drogérzékennyel szemben az **MDR1** mRNS és fehérje mennyisége kis mértékben indukálódott a p300 gátló kezelésre. A genomi hiszton acetiláltság csökkenésével egyidejűleg az acetil H3K4 szintje MDR1 specifikus régiókban megemelkedett. A HATi II az MCF7 sejtvonaltól eltérő génexpressziós és MDR1 kromatin szintű hatása lehet annak a következménye, hogy az MCF7-KCR sejtek a HATi II vegyületet xenobiotikumként érzékelik, melyek képesek a PgP kifejeződését indukálni. Egy másik elképzelés szerint egyes HAT-ok gátlása más hiszton acetiltranszferáz enzim vagy enzimek indukciójához járulhat hozzá a drogrezisztens sejtekben. Ez okozhatja a kimutatott acetil lizin mennyiségének növekedését. Ugyanakkor nem bizonyított, hogy a megfigyelt MDR1 expressziós szint emelkedés az acetil H3K4 lizin szint változásának következménye. Mivel a p300 számos nem-hiszton fehérje működésének szabályozásában

részt vesz, az MCF-KCR sejtekben az MDR1 gén kifejeződésében szerepet játszó transzkripciós faktor acetilációs állapotának megváltozása is kiválthatja a HATi II kezelés hatására történő MDR1 transzkriptumszint növekedést.

A p300 gátló kezelés nagymértékű **cFOS** mRNS szint emelkedést váltott ki, melynek hátterében a fentiekhez hasonló folyamatok vezethetnek, amellet, hogy a gén promóterének magas szintű hiszton acetiláltságának mértékében változás nem mutatható ki. A HATi II kezelés következtében az **RPIB9** gén expressziója nem változott, annak ellenére, hogy a promóter régiójában szignifikánsan megemelkedett az acetil H3K4 lizin mennyisége. Hasonló jelenséget tapasztaltunk a TSA kezelés esetében, amikor az RPIB9 gén kifejeződése nem indukálódott, amellet, hogy az acetil H4K12 módosítás szintje megnövekedett a promóter kromatinjában. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a drogrezisztens sejtekben a H3K4 és H4K12 lizinek acetilálódása nem elégséges az RPIB9 gén transzkripció mértékének további emeléséhez.

A drogrezisztens sejtvonalban megváltozott az acetil lizinek kialakításának és fenntartásának szabályozása.

Fentebbi eredményeink arra utalnak, hogy a drogérzékeny és -rezisztens sejtvonalakban eltérő a vizsgált **hiszton módosítások kialakításának és fenntartásának a szabályozása** (20. ábra). A magas globális hiszton acetilációs szintet okozhatja a megemelkedett HAT aktivitás. A p300 expressziójának mértékében nincs különbség a sejtvonalak között. A PCAF gén drogrezisztens sejtekben lecsökkent transzkripciós aktivitását a GCN5 emelkedett expressziós szintje kompenzálja.



20. ábra. Az MCF7-KCR sejtekben módosult a hiszton acetiláció szabályozása, melyre a teljes genom és az MDR1 gén szintjén végzett vizsgálatok eredményei mutatnak rá.

A magas globális hiszton acetilációs szintet kiválthatja a hiszton deacetilázok lecsökkent aktivitása vagy hiánya is, ezért megvizsgáltuk tizenkét, különböző HDAC csoportokba tartozó enzim mRNS szintjét. Valószínű, hogy a megfigyelt eltérés - a HDAC5 gén expressziójának indukciója, a SIRT7 kifejeződésének repressziója- mellett egyéb, a hiszton deacetilázok működését szabályozó mechanizmusok is eltérnek az MCF7-KCR sejtekben az MCF7 sejtekhez képest. Az általunk vizsgált drogrezisztens sejtvonalban az acetil H3K9 deacetilálására is képes SIRT1 (Ropero and Esteller 2007) expressziója változatlan maradt. A csökkent expressziójú SIRT7 a nukleoluszra jellemző sirtuin, az RNS polimeráz I transzkripciójának pozitív regulátora és *in vitro* képes szabályozni a p53 transzkripció faktor acetiláltságát (Olmos, Brosens et al. 2010), hiszton deacetiláz specificitása azonban nem ismert. A génkifejeződés mértéke mellett módosulhat a deacetilázok aktivitása is, működésüket szabályozó fehérjékkel való kölcsönhatás vagy poszttranszlációs fehérjemódosítások is befolyásolják. Tehát még számos, általunk nem vizsgált mechanizmus révén kialakulhat a megemelkedett globális hiszton acetilációs szint. Érdeemes lenne sirtuin specifikus hiszton deacetiláz inhibitor segítségével vizsgálni az ebbe a csoportba tartozó HDAC-ok szabályozó szerepét is a hiszton acetilációban és MDR1 expressziójában.

Összefoglalva eredményeinket, azt találtuk, hogy a hosszú idejű drog szelekcióval kialakított MCF7-KCR magas MDR1 mRNS szintjéhez több mechanizmus, genetikai és epigenetikai változások is hozzájárulnak. Egyrészt a drogrezisztens sejtekben a gén magasabb kópiaszámú, másrészt megnövekedett transzkripciós aktivitású. A drogrezisztens sejtek aktív génműködésével egyidejűleg nagy mértékben megemelkedik a transzkripciós start hely környékén az acetil H3K9 lizin módosítás szintje. Az MDR1 gén indukciója drogérzékeny sejtekben is együtt jár a H3K9 lizin acetilációs módosításával. A drogérzékeny sejtekben a PCAF HAT MDR1 transzkripció szabályozó szerepű. Az MCF7-KCR sejtekben a PCAF és a GCN5 egymást helyettesíti az MDR1 kifejeződésének szabályozásában.

A drogérzékeny sejtekben a potenciális tumorelles szer, a trichostatin A indukálja a többszörös gyógyszerrezisztencia kialakulását, ugyanakkor a drogrezisztens sejtekben az MDR1 expresszióját nem befolyásolja. Ez arra mutat rá, hogy a multidrog rezisztens tumorsejtekben anélkül tesztelhető a TSA lehetséges tumorelles szerepe, hogy tovább növelné azok többszörös gyógyszerrezisztenciájának mértékét. A drogrezisztens sejtvonalban a kevésbé specifikus HAT inhibitor vegyület a várakozásokkal ellentétben nem gátolja, hanem növeli a gén transzkripciós aktivitását. Azonban több HAT specifikus csendesítése mRNS szint csökkenéssel jár, mely alapján elképzelhető, hogy a jövőben az MDR1 génextpresszió szabályozása hiszton acetilációt befolyásoló terápiával történjen.

Az általános elképzelés szerint a kromatin acetiláltságának mértéke korrelál az onnan átíródó transzkriptumok mennyiségével. Kísérleteink arra utalnak, hogy a génextpresszió során csak specifikus lizinek acetiláltsági szintje emelkedik meg. Egyes acetil lizinek mennyiségének emelkedése nem feltétlenül vezet a transzkripció mértékének további növekedéséhez. Ugyanakkor a génkifejeződés változásával egyidejűleg az acetil lizinek szintje változatlan maradhat.

A drogrezisztens sejtek módosult hiszton acetilációs szabályozására utal a specifikus acetil lizinek genomi szintű vizsgálatának eredménye, illetve a hiszton acetiltranszferázok és hiszton deacetilázok expressziós mintázatának összehasonlítása is. Mindezek arra mutatnak rá, hogy hosszú kemoterápiás kezelés hatására a kialakuló drogrezisztens tumoros sejtekben felborulhat a hiszton acetiláció szabályozási egyensúlya. Eredményeink kiemelik a tumorsejt hiszton acetilációs állapot vizsgálatának jelentőségét

olyan terápiás szerek alkalmazása esetén, melyek a hiszton acetiláció befolyásolásával fejtik ki hatásukat.

Legfontosabb tudományos eredmények

1. A drogrezisztens MCF7-KCR sejtvonalban az MDR1 gén magas expressziós szintű, mely részben a gén amplifikálódásának köszönhető. A megemelkedett transzkriptum szint kialakításában az mRNS stabilitásának megváltozása nem játszik szerepet.
2. Az MCF7-KCR sejtekben a drogérzékeny MCF7 sejtekhez képest megemelkedett az acetil H3K4, H3K9, H3K14, H3K18, H4K8 és H4K12 lizinek genomi mennyisége.
3. Az MCF7-KCR sejtekben az acetil H3K9 szintje az MDR1 downstream promóterén és az azt követő exon kromatinjában nagy mértékben, a H3K4ac és H4K8ac szintje a gén átírt régióiban kis mértékben megnövekedett.
4. Egyes HDAC gének, illetve a PCAF és GCN5 HAT gének expressziós szintjében eltérés mutatható ki a drogérzékeny és –rezisztens sejtvonalak között.
5. Az MCF7 sejtekben HDAC gátló TSA kezelést követően fokozódott számos lizin globális acetiláltsági szintje. A kezelés hatására indukálódó MDR1 expressziót a gén kromatinjában megemelkedő acetil H3K4 és H3K9 szint kísérte.
6. Az MCF7-KCR sejtekben TSA hatására nem változott meg az acetil lizinek globális színje. Az MDR1 mRNS mennyisége változatlan maradt, azonban a gén kromatinjában megemelkedett a H4K12 lizin acetiláltsági szintje.
7. Az MCF7 sejtekben a PCAF és ADA2B csendesítése gátolta, a GCN5 specifikus siRNS kezelés nem változtatta meg az MDR1 transzkripcióját.
8. Az MCF7-KCR sejtekben a PCAF, az ADA2B illetve a GCN5 gátlása nem befolyásolta az MDR1 kifejeződését, azonban a PCAF és GCN5 együttes csendesítésével lecsökkenthető a magas MDR1 mRNS szint.

9. A p300 HAT-ot nagymértékben, a GCN5 HAT-ot kis mértékben gátló HATiII kezelés hatására mindkét sejtvonalban egyaránt lecsökkent a legtöbb vizsgált acetyl lizin genomi mennyisége.
10. A HATi II kezelés az MCF7 sejtekben nem volt hatással az MDR1 mRNS szintjére és nem okozott változást a gén kromatinjának acetiláltságában. Ezzel szemben az MCF7-KCR sejtekben fokozta az MDR1 kifejeződését és növelte a H3K4 lizin acetilációját a gén downstream promóterén.

7. Irodalomjegyzék

- Abolhoda, A., A. E. Wilson, et al. (1999). "Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin." Clin Cancer Res **5**(11): 3352-6.
- Allis, C. D., S. L. Berger, et al. (2007). "New nomenclature for chromatin-modifying enzymes." Cell **131**(4): 633-6.
- Anamika, K., A. R. Krebs, et al. (2010). "Lessons from genome-wide studies: an integrated definition of the coactivator function of histone acetyl transferases." Epigenetics Chromatin **3**(1): 18.
- Ashraf, N., S. Zino, et al. (2006). "Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer." Br J Cancer **95**(8): 1056-61.
- Baker, E. K., R. W. Johnstone, et al. (2005). "Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs." Oncogene **24**(54): 8061-75.
- Barlesi, F., G. Giaccone, et al. (2007). "Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer." J Clin Oncol **25**(28): 4358-64.
- Berndsen, C. E. and J. M. Denu (2008). "Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases." Curr Opin Struct Biol **18**(6): 682-9.
- Bernstein, B. E., A. Meissner, et al. (2007). "The mammalian epigenome." Cell **128**(4): 669-81.
- Bird, A. (2007). "Perceptions of epigenetics." Nature **447**(7143): 396-8.
- Blagosklonny, M. V. (2001). "Treatment with inhibitors of caspases, that are substrates of drug transporters, selectively permits chemotherapy-induced apoptosis in multidrug-resistant cells but protects normal cells." Leukemia **15**(6): 936-41.
- Bourguignon, L. Y., W. Xia, et al. (2009). "Hyaluronan-mediated CD44 interaction with p300 and SIRT1 regulates beta-catenin signaling and NFkappaB-specific transcription activity leading to MDR1 and Bcl-xL gene expression and chemoresistance in breast tumor cells." J Biol Chem **284**(5): 2657-71.
- Carey, M., B. Li, et al. (2006). "RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation." Mol Cell **24**(3): 481-7.
- Castro-Galache, M. D., J. A. Ferragut, et al. (2003). "Susceptibility of multidrug resistance tumor cells to apoptosis induction by histone deacetylase inhibitors." Int J Cancer **104**(5): 579-86.
- Chattopadhyay, R., S. Das, et al. (2008). "Regulatory role of human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in YB-1-mediated activation of the multidrug resistance gene MDR1." Mol Cell Biol **28**(23): 7066-80.
- Chaudhary, P. M. and I. B. Roninson (1993). "Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs." J Natl Cancer Inst **85**(8): 632-9.
- Chekhun, V. F., N. Y. Lukyanova, et al. (2007). "Epigenetic profiling of multidrug-resistant human MCF-7 breast adenocarcinoma cells reveals novel hyper- and hypomethylated targets." Mol Cancer Ther **6**(3): 1089-98.
- Chen, K. G., Y. C. Wang, et al. (2005). "Genetic and epigenetic modeling of the origins of multidrug-resistant cells in a human sarcoma cell line." Cancer Res **65**(20): 9388-97.

- Cho, H., G. Orphanides, et al. (1998). "A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure." *Mol Cell Biol* **18**(9): 5355-63.
- Chu, F., P. M. Chou, et al. (2005). "Control of multidrug resistance gene *mdr1* and cancer resistance to chemotherapy by the longevity gene *sirt1*." *Cancer Res* **65**(22): 10183-7.
- Collas, P. (2009). "The state-of-the-art of chromatin immunoprecipitation." *Methods Mol Biol* **567**: 1-25.
- Costi, R., R. Di Santo, et al. (2007). "Cinnamoyl compounds as simple molecules that inhibit p300 histone acetyltransferase." *J Med Chem* **50**(8): 1973-7.
- David, G. L., S. Yegnasubramanian, et al. (2004). "MDR1 promoter hypermethylation in MCF-7 human breast cancer cells: changes in chromatin structure induced by treatment with 5-Aza-cytidine." *Cancer Biol Ther* **3**(6): 540-8.
- Dekker, F. J. and H. J. Haisma (2009). "Histone acetyl transferases as emerging drug targets." *Drug Discov Today* **14**(19-20): 942-8.
- El-Khoury, V., G. Breuzard, et al. (2007). "The histone deacetylase inhibitor trichostatin A downregulates human MDR1 (ABCB1) gene expression by a transcription-dependent mechanism in a drug-resistant small cell lung carcinoma cell line model." *Br J Cancer* **97**(4): 562-73.
- El-Osta, A., P. Kantharidis, et al. (2002). "Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation." *Mol Cell Biol* **22**(6): 1844-57.
- Elsheikh, S. E., A. R. Green, et al. (2009). "Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome." *Cancer Res* **69**(9): 3802-9.
- Fairchild, C. R., S. P. Ivy, et al. (1987). "Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adriamycin-resistant human breast cancer cells." *Cancer Res* **47**(19): 5141-8.
- Filenko, N. A., C. Kolar, et al. "The role of histone H4 biotinylation in the structure of nucleosomes." *PLoS One* **6**(1): e16299.
- Fojo, A. T., J. Whang-Peng, et al. (1985). "Amplification of DNA sequences in human multidrug-resistant KB carcinoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(22): 7661-5.
- Fraga, M. F., E. Ballestar, et al. (2005). "Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer." *Nat Genet* **37**(4): 391-400.
- Gallinari, P., S. Di Marco, et al. (2007). "HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics." *Cell Res* **17**(3): 195-211.
- Gamper, A. M., J. Kim, et al. (2009). "The STAGA subunit ADA2b is an important regulator of human GCN5 catalysis." *Mol Cell Biol* **29**(1): 266-80.
- Gatta, R. and R. Mantovani "Single nucleosome ChIPs identify an extensive switch of acetyl marks on cell cycle promoters." *Cell Cycle* **9**(11): 2149-59.
- Grant, P. A., A. Eberharter, et al. (1999). "Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes." *J Biol Chem* **274**(9): 5895-900.
- Hajkova, P., S. J. Jeffries, et al. (2010). "Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway." *Science* **329**(5987): 78-82.

- Hauswald, S., J. Duque-Afonso, et al. (2009). "Histone deacetylase inhibitors induce a very broad, pleiotropic anticancer drug resistance phenotype in acute myeloid leukemia cells by modulation of multiple ABC transporter genes." Clin Cancer Res **15**(11): 3705-15.
- Hazzalin, C. A. and L. C. Mahadevan (2005). "Dynamic acetylation of all lysine 4-methylated histone H3 in the mouse nucleus: analysis at c-fos and c-jun." PLoS Biol **3**(12): e393.
- Herranz, D. and M. Serrano (2010). "SIRT1: recent lessons from mouse models." Nat Rev Cancer **10**(12): 819-23.
- Hui, R. C., R. E. Francis, et al. (2008). "Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) in K562 leukemic cells." Mol Cancer Ther **7**(3): 670-8.
- Huo, H., P. G. Magro, et al. (2010). "Histone methyltransferase MLL1 regulates MDR1 transcription and chemoresistance." Cancer Res **70**(21): 8726-35.
- Iyer, N. G., H. Ozdag, et al. (2004). "p300/CBP and cancer." Oncogene **23**(24): 4225-31.
- Iyer, N. G., J. Xian, et al. (2007). "p300 is required for orderly G1/S transition in human cancer cells." Oncogene **26**(1): 21-9.
- Jin, Q., L. R. Yu, et al. (2011). "Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation." EMBO J **30**(2): 249-62.
- Jin, S. and K. W. Scotto (1998). "Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y." Mol Cell Biol **18**(7): 4377-84.
- Jin, W., Y. Liu, et al. (2009). "UHRF1 inhibits MDR1 gene transcription and sensitizes breast cancer cells to anticancer drugs." Breast Cancer Res Treat.
- Johnsson, A. E. and A. P. Wright (2010). "The role of specific HAT-HDAC interactions in transcriptional elongation." Cell Cycle **9**(3): 467-71.
- Johnstone, R. W. (2002). "Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer." Nat Rev Drug Discov **1**(4): 287-99.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2007). "The epigenomics of cancer." Cell **128**(4): 683-92.
- Kalkhoven, E. (2004). "CBP and p300: HATs for different occasions." Biochem Pharmacol **68**(6): 1145-55.
- Kapoor, A., F. Agius, et al. (2005). "Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation." FEBS Lett **579**(26): 5889-98.
- Kars, M. D., O. D. Iseri, et al. (2006). "Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds." Anticancer Res **26**(6B): 4559-68.
- Kaszubiak, A., P. S. Holm, et al. (2007). "Overcoming the classical multidrug resistance phenotype by adenoviral delivery of anti-MDR1 short hairpin RNAs and ribozymes." Int J Oncol **31**(2): 419-30.
- Katsumoto, T., N. Yoshida, et al. (2008). "Roles of the histone acetyltransferase monocytic leukemia zinc finger protein in normal and malignant hematopoiesis." Cancer Sci **99**(8): 1523-7.
- Kim, S. N., N. H. Kim, et al. (2009). "Histone deacetylase inhibitor induction of P-glycoprotein transcription requires both histone deacetylase 1 dissociation and recruitment of CAAT/enhancer binding protein beta and pCAF to the promoter region." Mol Cancer Res **7**(5): 735-44.

- Klug, M., S. Heinz, et al. (2010). "Active DNA demethylation in human postmitotic cells correlates with activating histone modifications, but not transcription levels." Genome Biol **11**(6): R63.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.
- Labialle, S., L. Gayet, et al. (2002). "Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views." Biochem Pharmacol **64**(5-6): 943-8.
- Lane, A. A. and B. A. Chabner (2009). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy." J Clin Oncol **27**(32): 5459-68.
- Lee, B. M. and L. C. Mahadevan (2009). "Stability of histone modifications across mammalian genomes: implications for 'epigenetic' marking." J Cell Biochem **108**(1): 22-34.
- Lee, T. B., J. H. Park, et al. (2008). "Epigenetic mechanisms involved in differential MDR1 mRNA expression between gastric and colon cancer cell lines and rationales for clinical chemotherapy." BMC Gastroenterol **8**: 33.
- Leonessa, F. and R. Clarke (2003). "ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer." Endocr Relat Cancer **10**(1): 43-73.
- Liu, B. L., J. X. Cheng, et al. (2010). "Global histone modification patterns as prognostic markers to classify glioma patients." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(11): 2888-96.
- Loyola, A. and G. Almouzni (2007). "Marking histone H3 variants: how, when and why?" Trends Biochem Sci **32**(9): 425-33.
- Lu, C., Q. Shen, et al. (2005). "cFos is critical for MCF-7 breast cancer cell growth." Oncogene **24**(43): 6516-24.
- Manuyakorn, A., R. Paulus, et al. (2010). "Cellular histone modification patterns predict prognosis and treatment response in resectable pancreatic adenocarcinoma: results from RTOG 9704." J Clin Oncol **28**(8): 1358-65.
- Michan, S. and D. Sinclair (2007). "Sirtuins in mammals: insights into their biological function." Biochem J **404**(1): 1-13.
- Mickley, L. A., B. A. Spengler, et al. (1997). "Gene rearrangement: a novel mechanism for MDR-1 gene activation." J Clin Invest **99**(8): 1947-57.
- Milde-Langosch, K. (2005). "The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis." Eur J Cancer **41**(16): 2449-61.
- Nagy, Z., A. Riss, et al. (2010). "The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes." Cell Mol Life Sci **67**(4): 611-28.
- Nagy, Z., A. Riss, et al. (2009). "The human SPT20-containing SAGA complex plays a direct role in the regulation of endoplasmic reticulum stress-induced genes." Mol Cell Biol **29**(6): 1649-60.
- Nagy, Z. and L. Tora (2007). "Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation." Oncogene **26**(37): 5341-57.
- Nakayama, M., M. Wada, et al. (1998). "Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias." Blood **92**(11): 4296-307.

- Nightingale, K. P., S. Gendreizig, et al. (2007). "Cross-talk between histone modifications in response to histone deacetylase inhibitors: MLL4 links histone H3 acetylation and histone H3K4 methylation." *J Biol Chem* **282**(7): 4408-16.
- Oh, W. K., K. B. Cho, et al. (2010). "Amurensin G, a potent natural SIRT1 inhibitor, rescues doxorubicin responsiveness via down-regulation of multidrug resistance 1." *Mol Pharmacol* **78**(5): 855-64.
- Okumura, K., M. Mendoza, et al. (2006). "PCAF modulates PTEN activity." *J Biol Chem* **281**(36): 26562-8.
- Olmos, Y., J. J. Brosens, et al. (2010). "Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer." *Drug Resist Updat*.
- Orpinell, M., M. Fournier, et al. (2010). "The ATAC acetyl transferase complex controls mitotic progression by targeting non-histone substrates." *EMBO J* **29**(14): 2381-94.
- Park, Y. S., M. Y. Jin, et al. (2008). "The global histone modification pattern correlates with cancer recurrence and overall survival in gastric adenocarcinoma." *Ann Surg Oncol* **15**(7): 1968-76.
- Racki, L. R. and G. J. Narlikar (2008). "ATP-dependent chromatin remodeling enzymes: two heads are not better, just different." *Curr Opin Genet Dev* **18**(2): 137-44.
- Raguz, S., M. T. De Bella, et al. (2005). "Expression of RPIP9 (Rap2 interacting protein 9) is activated in breast carcinoma and correlates with a poor prognosis." *Int J Cancer* **117**(6): 934-41.
- Raguz, S., R. A. Randle, et al. (2008). "Production of P-glycoprotein from the MDR1 upstream promoter is insufficient to affect the response to first-line chemotherapy in advanced breast cancer." *Int J Cancer* **122**(5): 1058-67.
- Raguz, S., M. Tamburo De Bella, et al. (2004). "Activation of the MDR1 upstream promoter in breast carcinoma as a surrogate for metastatic invasion." *Clin Cancer Res* **10**(8): 2776-83.
- Rodriguez-Navarro, S. (2009). "Insights into SAGA function during gene expression." *EMBO Rep* **10**(8): 843-50.
- Ropero, S. and M. Esteller (2007). "The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer." *Mol Oncol* **1**(1): 19-25.
- Schiltz, R. L., C. A. Mizzen, et al. (1999). "Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates." *J Biol Chem* **274**(3): 1189-92.
- Schreiber, S. L. and B. E. Bernstein (2002). "Signaling network model of chromatin." *Cell* **111**(6): 771-8.
- Scotto, K. W. (2003). "Transcriptional regulation of ABC drug transporters." *Oncogene* **22**(47): 7496-511.
- Scotto, K. W., J. L. Biedler, et al. (1986). "Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells." *Science* **232**(4751): 751-5.
- Seligson, D. B., S. Horvath, et al. (2009). "Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers." *Am J Pathol* **174**(5): 1619-28.
- Seligson, D. B., S. Horvath, et al. (2005). "Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence." *Nature* **435**(7046): 1262-6.
- Sengupta, S., A. K. Mantha, et al. (2011). "Human AP endonuclease (APE1/Ref-1) and its acetylation regulate YB-1-p300 recruitment and RNA polymerase II loading in the

- drug-induced activation of multidrug resistance gene MDR1." *Oncogene* **30**(4): 482-93.
- Shechter, D., H. L. Dormann, et al. (2007). "Extraction, purification and analysis of histones." *Nat Protoc* **2**(6): 1445-57.
- Shen, D. W., A. Fojo, et al. (1986). "Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification." *Science* **232**(4750): 643-5.
- Shen, Q., I. P. Uray, et al. (2008). "The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors." *Oncogene* **27**(3): 366-77.
- Shi, Y. and J. R. Whetstone (2007). "Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases." *Mol Cell* **25**(1): 1-14.
- Stein, U., W. Walther, et al. (2008). "Complete in vivo reversal of the multidrug resistance phenotype by jet-injection of anti-MDR1 short hairpin RNA-encoding plasmid DNA." *Mol Ther* **16**(1): 178-86.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." *Nature* **403**(6765): 41-5.
- Szakacs, G., J. K. Paterson, et al. (2006). "Targeting multidrug resistance in cancer." *Nat Rev Drug Discov* **5**(3): 219-34.
- Tabe, Y., M. Konopleva, et al. (2006). "Up-regulation of MDR1 and induction of doxorubicin resistance by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) and ATRA in acute promyelocytic leukemia cells." *Blood* **107**(4): 1546-54.
- Taylor, K. H., K. E. Pena-Hernandez, et al. (2007). "Large-scale CpG methylation analysis identifies novel candidate genes and reveals methylation hotspots in acute lymphoblastic leukemia." *Cancer Res* **67**(6): 2617-25.
- Tian, K., V. Jurukovski, et al. (2005). "Epigenetic regulation of WTH3 in primary and cultured drug-resistant breast cancer cells." *Cancer Res* **65**(21): 10024-31.
- Tie, F., T. Furuyama, et al. (2001). "The Drosophila Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3." *Development* **128**(2): 275-86.
- Ueda, K., D. P. Clark, et al. (1987). "The human multidrug resistance (*mdr1*) gene. cDNA cloning and transcription initiation." *J Biol Chem* **262**(2): 505-8.
- Vasiliou, V., K. Vasiliou, et al. (2009). "Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family." *Hum Genomics* **3**(3): 281-90.
- Wang, Z., C. Zang, et al. (2009). "Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes." *Cell* **138**(5): 1019-31.
- Wang, Z., C. Zang, et al. (2008). "Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome." *Nat Genet* **40**(7): 897-903.
- Woodcock, C. L. and R. P. Ghosh (2010). "Chromatin higher-order structure and dynamics." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(5): a000596.
- Yague, E., A. L. Armesilla, et al. (2003). "P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation." *J Biol Chem* **278**(12): 10344-52.
- Yamada, H., Y. Arakawa, et al. (2006). "Depsipeptide-resistant KU812 cells show reversible P-glycoprotein expression, hyper-acetylated histones, and modulated gene expression profile." *Leuk Res* **30**(6): 723-34.
- Yatouji, S., V. El-Khoury, et al. (2007). "Differential modulation of nuclear texture, histone acetylation, and MDR1 gene expression in human drug-sensitive and -resistant OV1 cell lines." *Int J Oncol* **30**(4): 1003-9.

- Zhou, H., H. Hu, et al. "Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms." Biol Cell **102**(12): 645-55.
- Zhu, C., Y. R. Qin, et al. (2009). "Characterization of tumor suppressive function of P300/CBP-associated factor at frequently deleted region 3p24 in esophageal squamous cell carcinoma." Oncogene **28**(31): 2821-8.
- Zhu, H., H. Wu, et al. (2008). "Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells." Biochem Pharmacol **76**(5): 582-8.
- Zsindely, N., T. Pankotai, et al. (2009). "The loss of histone H3 lysine 9 acetylation due to dSAGA-specific dAda2b mutation influences the expression of only a small subset of genes." Nucleic Acids Res **37**(20): 6665-80.

8. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Bálint Évának munkám lelkiismeretes irányításáért és az alkalmazott módszerek elsajátításában nyújtott segítségéért.

Köszönöm Prof. Dr. Kondorosi Évának, hogy támogatta a BAY-GEN-ben folyó munkába való bekapcsolódásomat és kutatómunkámat, a következő pályázat segítségével: NKTH pályázat OMFB-00441/2007 Teller Ede Program NAP-BIO 06/1

Köszönetet mondok Prof. Dr. Boros Imrének, hogy biztosította a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszékkel való együttműködés lehetőségét, és tanácsaival támogatta munkánkat.

Hálás vagyok a BAY-GEN valamennyi munkatársának, különösen munkacsoportunk hallgatóinak és Gyenis Ákosnak segítőkészségükért, együttműködésükért. Továbbá köszönettel tartozom a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszéken dolgozóknak, hogy kérdéseimmel, kéréseimmel bármikor szívesen fogadtak.

Köszönetet mondok Prof. Molnár Józsefnek (Szegedi Tudományegyetem Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézet, Szegedi Rákkutatásért Alapítvány) a MCF7 és az MCF7-KCR sejtvonalakért; Prof. Tora Lászlónak (IGBMC, Illkirch, Franciaország) a GCN5 és PCAF ellenanyagokért; Didier Devys-nek (IGBMC, Illkirch, Franciaország) az ADA2B ellenanyagért, Szakács Gergelynek (Semmelweis Egyetem, Budapest) az MDR1 ellenanyagért. Külön köszönöm Dr. Kucsma Nóra áldozatkészségét (Semmelweis Egyetem, Budapest).

Hálával tartozom Dr. Fekete Csabának és Dr. Gereben Balázsnak (MTA KOKI, Budapest), hogy támogatták a hátramaradt kísérletek elvégzését, és lehetővé tették a dokori értekezés befejezését.

9. Összefoglaló

A DNS, hiszton és nem-hiszton fehérjék alkotta kromatin szerkezetét a citozin bázisok és a hiszton fehérjék kémiai módosításai befolyásolják, ezáltal a DNS-hez való hozzáférést szabályozzák a transzkripció, DNS-javítás, replikáció során. A hiszton kód hipotézis szerint az egyes hiszton fehérjék poszttranszlációs módosításainak kombinációja további szabályozó faktorok által leolvasott felületet alakít ki. A hipotézist bizonyítva, egyre több kísérletes adat mutatja, hogy specifikus hiszton módosítások kombinációja szükséges a különböző kromatin alapú folyamatok szabályozásához.

A hiszton fehérjék N-terminálisán lévő lizin aminosavak acetilációs módosítása többnyire pozitívan korrelál a génkifejeződéssel, de további vizsgálatok szükségesek annak a megállapítására, hogy a megemelkedett hiszton acetiláció a génátírás feltétele vagy annak következménye. A kromatin hiszton acetilációs állapotát két, egymással ellentétesen ható enzimescsoport, a hiszton acetiltranszferázok (HAT) és hiszton-deacetilázok (HDAC) szabályozzák. Kísérleteinkben a GCN5 (general control nonderepressible 5) és PCAF (p300/CBP associated factor), illetve a p300 és CBP (CREB binding protein) homológ hiszton acetiltranszferázok transzkripcióban betöltött szabályozó szerepét vizsgáltuk.

Munkánk során a többszörös gyógyszerrezisztencia kialakulásának epigenetikai szabályozását tanulmányoztuk. A multidrog rezisztens tumoros sejtekben a leggyakrabban leírt mechanizmus szerint megnövekszik a plazmamembránon diffúzióval átjutó hidrofób anyagok energiaigényes kipumpálásának mértéke. Ennek jól ismert esete az ABC (ATP binding cassette) családba tartozó transzporterek fokozott működése. Daganatos betegekben leggyakrabban az ABCB1/MDR1 (multidrug resistance gene 1) gén által kódolt P-glikoprotein (PgP) fehérjének van szerepe a többszörös gyógyszerrezisztencia kialakításában.

A vizsgálatok szerint a kemoterápia során megemelkedik az MDR1 gén kifejeződésének mértéke. A transzkripciós faktorok az MDR1 promóter elemeihez való kötődése a kromatin szintjén szabályozott és ezzel összefüggésben, az elmúlt évtizedben vált ismertté, hogy az MDR1 gén transzkripciójának epigenetikus szabályozásában a promóter DNS metiláltsága mellett kulcsszerepe van a kromatin acetiláltsági állapotának. A PCAF, p300 és CBP HAT-ok aktiválják az MDR1 promótert; az enzimek jelenlétét az

aktívan átíródó gén promóter régiójában *in vivo* is kimutatták, ezek egymáshoz való viszonya azonban nem tisztázott.

Mivel a PgP magas szintjével csökken a tumoros beteg túlélési ideje, így hosszú ideje vizsgálatok folynak a többszörös gyógyszerrezisztencia leküzdésére. Klinikai tesztelés alatt néhány olyan szer áll, amelyek a transzporterek működését gátolják, azonban számos egyéb lehetőséget vizsgálnak, amelyek megakadályozhatják a multidrog rezisztens tumorsejtek kialakulását. Az MDR1 gén transzkripciójának szabályozásában több hiszton acetiltranszferáz és hiszton deacetiláz részt vesz, ezért ezek aktivitásának befolyásolása HDAC illetve HAT inhibitorokkal lehetőséget adhat a PgP kifejeződésének gátlására. A HAT inhibitorokkal szemben, a HDAC gátlószer, mint a tumorelles terápia része, széles körben tanulmányozottak. Néhány vegyület preklinikai ill. klinikai tesztelés alatt áll, annak ellenére, hogy e szerek terápiás felhasználási körét szűkítheti csendes gének, illetve protoonkogének lehetséges aktiválódása.

Célkitűzések

Célunk az MDR1 gén kódolta PgP kifejeződés epigenetikus szabályozásának vizsgálata volt doxorubicin érzékeny és rezisztens MCF7 humán emlőkarcinóma sejtvonalakban. A következő kérdésekre kerestük a választ:

1. A drogrezisztens sejtvonal doxorubicin rezisztenciája összefüggésbe hozható-e az MDR1 gén megemelkedett expressziójával? Ha kimutatható az MDR1 mRNS szint növekedés, ez génamplifikációnak, magas promóter aktivitásnak vagy az mRNS megváltozott stabilitásának köszönhető?
2. Magas MDR1 promóter aktivitás esetén annak fenntartásában milyen szerepe van a hiszton acetilációnak? Korábban is leírták, hogy drogrezisztens sejtekben megemelkedik az MDR1 transzkripciósan aktív promóter régiójában az acetilált hisztonok szintje, azonban nem ismert, hogy mely lizin aminosavakhoz kapcsolódik acetil csoport illetve a promóter kromatinján kívül a gén egyéb régióira milyen hiszton acetilációs módosítás jellemző.
3. Hogyan befolyásolja az MDR1 gén expressziós szintjét a hiszton acetilációs mintázat módosítása HDAC és HAT inhibitorok segítségével? Lecsökkenthető a drog rezisztens sejtvonalban a magas MDR1 mRNS szint a hiszton acetilációt befolyásoló kezelésekkel?

4. Az MDR1 gén specifikus hiszton acetilációs mintázatának fenntartásában milyen szerepet töltenek be a p300, GCN5 és PCAF hiszton acetiltranszferázok? Utóbbiak mely HAT komplex részeként vesznek részt az esetleges transzkripció szabályozásban?

Eredmények és értékelésük

A növekvő koncentrációjú doxorubicin kezeléssel létrehozott rezisztens MCF7-KCR sejtvonalban genetikai és epigenetikai változások is hozzájárulnak az MDR1 gén magas szintű kifejeződéséhez. Egyrészt a gén amplifikálódott. Másrészt az mRNS mennyiségének öt nagyságrendbeli megemelkedése a drogrezisztens sejtekben a magas MDR1 promóter aktivitásra utal, amelyet a gén kromatinjában epigenetikai változás kísérhet. Az általunk vizsgált MCF-KCR sejtvonalban a PgP kifejeződését az mRNS stabilitásának módosulása nem befolyásolja.

A humán MDR1 gén transzkripciója két alternatív transzkripciós start helytől iniciálódhat. A downstream promóterrel ellentétben, a fő transzkripciós start helytől 112 kb távolságra lévő upstream promóter aktivitásában az MCF7 és MCF7-KCR sejtek nem mutatnak különbséget. Azonban a DNS másik száláról, átfedően átíródó, máig nem tisztázott funkciójú RPIB9/RUNDC3B gén expressziója a drogrezisztens sejtvonalban megemelkedett a drogérzékeny sejtvonalhoz képest.

Az MDR1 génkifejeződés epigenetikai szabályozását kromatin immunprecipitáció segítségével tanulmányozva, meghatároztuk a H3K4, H3K9, H3K14, H4K8 és H4K12 lizinek acetilációs módosításának mértékét a génlókus transzkripciót szabályozó régiókban és az átíródó génszakaszok kromatinjában. A drogrezisztens MCF7-KCR sejtvonalban az MDR1 upstream promóter és az azt követő első exon kromatin régiójában az alacsony acetil lizin módosítási szint korrelál az innen átíródó transzkriptum hiányával. Az MDR1 gént aktívan kifejező MCF7-KCR sejtvonal esetében a gén downstream promóterében és az első exon régiójában nagymértékben megemelkedett az acetil H3K9 mennyisége. Aktív transzkripció során az MDR1 transzkripciós start helyének környezetében kis mértékű, szignifikáns emelkedés mutatható ki az acetil H3K4 szintjében; a géntest kromatinjában az acetil H3K4 és H4K8 lizin módosítás mértéke magasabb. Eredményeink összefüggnek a nemrégiben leírt megfigyeléssel, ami szerint a génnek 5' kódoló szakaszában nemcsak a

H3K4 lizin metilációjának, hanem acetilációs módosításának mértéke is korrelációt mutat a gén transzkripció aktivitásával.

Az MCF7-KCR sejtekben az RPIB9 magasabb expressziós aktivitásával egyidejűleg a gén promóterében az MCF7 sejtekhez viszonyítva kis mértékben szignifikánsan több acetilált H3K9 mutatható ki. Tehát a specifikus lizin módosítás szintje a drogrezisztens sejtekben a magas expressziós szintű MDR1 és RPIB9 gének promóterében különböző mértékben, de megemelkedett a drogérzékeny sejtvonalhoz képest. Az acetil H3K9 módosításnak szerepe lehet a génátírás aktiválásában, illetve a transzkripcióan aktív kromatin szerkezet fenntartásában.

Az egyes acetil lizinek globális mennyiségét vizsgálva azt találtuk, hogy a drogrezisztencia kialakulása során nemcsak az MDR1 gén kromatinjában, hanem a teljes genomban megemelkedett a hiszton acetiláció mértéke. Irodalmi adatok alapján egyes drogrezisztens sejtvonalak hasonlóan magas acetil lizin módosítási szinttel jellemezhetőek, azonban az azt fenntartó mechanizmus nem ismert. Az MCF7-KCR sejtek megváltozott hiszton acetilációs szabályozására utal a sejtvonalak trichostatin A (TSA) hiszton deacetiláz gátló kezelése is. TSA hatására a drogrezisztens sejtekben a vizsgált lizinek acetilációjának mértéke a drogérzékeny sejtekkel szemben tovább nem növelhető.

Az MDR1 gén kifejeződésében a hiszton acetiláció szabályozó szerepére mutat rá, hogy a trichostatin A kezelés a doxorubicin érzékeny MCF7 sejtekben az MDR1 gén expresszióját indukálta. Ezzel szemben az MCF7-KCR sejtek génexpressziós mintázatára nem volt hatása a HDAC gátlásnak. A hiszton acetiláció genomi és MDR1 lókuszt szintű eltérő szabályozása is okozhatja, hogy a drogérzékeny és drogrezisztens sejtekben a HDAC gátlás különböző hatást fejt ki az MDR1 expresszióra. Az MCF7 sejtekben az acetil H3K4 és H3K9 lizinek mennyiségének emelkedése kísérte az MDR1 transzkripció indukcióját, az átíró géntest kromatinjában illetve a gén promóter régióiban és azokat követő első exonokban. A HDACi hatására MDR1 expresszióváltozást nem mutató MCF7-KCR sejtekben valamennyi vizsgált MDR1 specifikus régióban több acetil H4K12 lizin volt kimutatható. Ez arra utal, hogy egyes lizinek acetilációja nem elégséges az MDR1 expresszió további aktiválásához.

A hiszton deacetilázok gátlása mellett vizsgáltuk, hogy a GCN5/PCAF katalitikus alegységű hiszton acetiltranszferáz komplexek hiányában, melyek in vivo vizsgálatok eredménye alapján az acetil H3K9 módosítás kialakításában résztvesznek, hogyan változik

az MDR1 gén expressziója. Az általunk vizsgált drogérzékeny sejtvonal alapszintű MDR1 expressziója lecsökkent a PCAF HAT illetve az ADA2B HAT-komplex alegység specifikus lecsendesítésével. A PCAF enzimmal nagy homológiát mutató GCN5 hiánya nem befolyásolta az MCF7 sejtekben az MDR1 kifejeződését. Ez arra utal, hogy az MCF7 sejtekben a PCAF és ADA2B tartalmú HAT komplexnek az alapszintű MDR1 transzkripcióban szabályozó szerepe van. Eredményeink összefüggnek mások megfigyeléseivel, ami szerint a homológ HAT komplexek hasonló katalitikus aktivitásuk ellenére eltérő target géneket szabályozhatnak. A drogérzékeny sejtekkel ellentétben, a drogrezisztens sejtvonal MDR1 mRNS szintje nem csökkent le a PCAF, az ADA2B vagy a GCN5 fehérjék hiányában. Ugyanakkor a két homológ HAT egyidejű gátlásával alacsonyabb transzkriptum szintet mutattunk ki. Ez arra utal, hogy a drog rezisztens sejtekben a magas MDR1 mRNS mennyiség és ezzel egyidejűleg a H3K9 lizin megemelkedett acetilációs szintjének kialakításában és/vagy fenntartásában a PCAF és a GCN5 egymást helyettesítve vesznek részt.

A p300 HAT a vizsgált gének expressziójában, illetve a genomi és MDR1 gén szintű hiszton acetilációban betöltött szerepének vizsgálatához az enzim működését a HATi II vegyülettel gátoltuk. A nemrégiben leírt HATi II vegyület 5 μ M-os koncentrációban *in vitro* vizsgálatban nagyobb mértékben a p300, kisebb mértékben a GCN5 működését gátolta. Kísérleteinkben a 20 μ M koncentrációjú HATi II kezelés hatására mindkét sejtvonalban lecsökkent a H3K9, H3K14, H3K18 és H4K12 lizinek genomi acetiláltságának mértéke. A drogérzékeny sejtekben a 20 μ M koncentrációban alkalmazott HATi II szignifikánsan csökkentette az MDR1 expressziót. Ez a PCAF mellett a p300 transzkripció szabályozó szerepére utal az MCF7 sejtvonalban. A gén vizsgált kromatin régióiban nem változott szignifikánsan a specifikus acetil lizinek mennyisége a genomi szinten tapasztalt csökkenés ellenére. A HATi II kifejtheti génexpresszió csökkentő hatását más specifikus acetil lizinek kialakulását gátolva vagy a vegyület által befolyásolt hiszton acetilázok más fehérjékkel való kölcsönhatásának módosulása alapján.

A drogrezisztens sejtvonalban a drogérzékennyel szemben az MDR1 átírása indukálódott a p300 gátló kezelésre. A genomi hiszton acetiláltság csökkenésével egyidejűleg az acetil H3K4 szintje MDR1 specifikus régiókban megemelkedett. A HATi II az MCF7 sejtvonaltól eltérő génexpressziós és MDR1 kromatin szintű hatása lehet annak a következménye, hogy az MCF7-KCR sejtek a HATi II vegyületet xenobiotikumként

érzékelik, melyek számos szignálútvezetőt képesek indukálni. Egy másik elképzelés szerint egyes HAT-ok gátlása más hiszton acetiltranszferáz enzim vagy enzimek induciójához járulhat hozzá a drogrezisztens sejtekben. Ez okozhatja a kimutatott acetil lizin szint emelkedést. Ugyanakkor nem bizonyított, hogy az MDR1 expresszió mértékének növekedése az acetil H3K4 lizin szint változásának következménye. Mivel a p300 számos nemhiszton fehérje működésének szabályozásában részt vesz, a HATi II kiválthatja az MDR1 mRNS szint növekedést a génátírásban részt vevő faktorok működését befolyásolva.

Fentebbi eredményeink arra utalnak, hogy a drogérzékeny és -rezisztens sejtvonalakban eltérő a vizsgált hiszton módosítások kialakításának és fenntartásának a szabályozása. A magas globális hiszton acetilációs szintet okozhatja a megemelkedett HAT aktivitás, azonban a sejtvonalak között jelentős eltérés nem mutatható ki a vizsgált enzimek expressziójában. A megemelkedett genomi hiszton acetilációs szintet kiválthatja a hiszton deacetilázok lecsökkent aktivitása is. Valószínű, hogy a megfigyelt eltérés - a HDAC5 expressziójának indukciója, a SIRT7 kifejeződésének repressziója- mellett egyéb, a hiszton deacetilázok működését szabályozó mechanizmusok is eltérnek az MCF7-KCR sejtekben az MCF7 sejtekhez képest.

Összefoglalás

A hosszú idejű drog szelekcióval kialakított MCF7-KCR magas MDR1 mRNS szintjéhez genetikai és epigenetikai változások is hozzájárulnak. Egyrészt a drogrezisztens sejtekben a gén magasabb kópiaszámú, másrészt a gén megnövekedett transzkripciós aktivitású. A drogrezisztens sejtek aktív génműködésével egyidejűleg nagy mértékben megemelkedik a transzkripciós start hely környékén az acetil H3K9 lizin módosítás szintje. Az MDR1 gén indukciója drogérzékeny sejtekben is együtt jár a H3K9 lizin acetilációs módosításával. Az drogérzékeny MCF7 sejtekben a p300 és PCAF HAT-ok MDR1 transzkripció szabályozó szerepűek. Az MCF7-KCR sejtekben a PCAF és a GCN5 egymást helyettesíti a megemelkedett MDR1 mRNS szint fenntartásában.

Az általános elképzelés szerint a kromatin acetiláltságának mértéke korrelál az onnan átíródó transzkriptumok mennyiségével. Kísérleteink arra utalnak, hogy a génexpresszió során csak specifikus lizinek acetiláltsági szintje emelkedik meg. Azonban

az acetyl lizinek mennyiségének emelkedése nem feltétlenül vezet a transzkripció mértékének további növekedéséhez. Emellett a génkifejeződés változásával egyidejűleg az acetyl lizinek szintje változatlan maradhat.

A specifikus acetyl lizinek genomi szintű vizsgálatának eredménye a drogrezisztens sejtek módosult hiszton acetylációs szabályozására utal, azaz hosszú kemoterápiás kezelés hatására a kialakuló drogrezisztens tumoros sejtekben felborulhat a hiszton acetyláció szabályozási egyensúlya. Így eredményeink hozzájárulhatnak a hiszton módosítások daganatos sejtekben betöltött szerepének megértéséhez.

10. Summary

Chromatin consists of DNA, non-histone and histone proteins; its structure can be regulated by DNA methylation and covalent modifications of histones to allow access to DNA during transcription, DNA replication and repair. According to the hypothesis of histone code, the combination of specific posttranslational modifications of histones is required to recruit additional regulatory factors. Several experimental data support this hypothesis and indicate that multiple histone modifications act in a combinatorial manner to specify distinct chromatin functions.

Acetylation of lysine residues on histone N terminus usually correlates with transcription, although it remains to be determined whether increased histone acetylation is a cause or a consequence of gene expression. Histone acetylation is regulated by the opposing actions of histone acetyl transferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). We have examined the role of the homologous histone acetyl transferases GCN5 (general control nonderepressible 5) and PCAF (p300/CBP associated factor), as well as p300 and CBP (CREB binding protein) in the regulation of transcription.

We have studied the epigenetic regulation of multidrug resistance. A possible reason for failure of chemotherapy is the development of multidrug resistance in cancer cells, which is often caused by increased energy-dependent efflux of hydrophobic drugs that can enter the cell through diffusion. The drug efflux is mediated by the family of ABC (ATP binding cassette) transporters. The best characterized transporter protein is P-glycoprotein (PgP), which is encoded by the ABCB1/MDR1 (multidrug resistance 1) gene.

Clinical studies have described that MDR1 gene is often overexpressed during chemotherapy. Accessibility of transcriptional factors to MDR1 promoter elements are regulated at the chromatin level and the role of histone acetylation and deacetylation in the transcriptional regulation of MDR1 has been established. PCAF, p300 and CBP HATs co-activate MDR1 promoter reporter constructs. Binding of these HATs to the MDR1 promoter has been demonstrated *in vivo* as well, but their function is not fully understood. As PgP expression is correlated with shorter survival of patients, several attempts have been made to combat multidrug resistance during the past decades. Some compounds, which inhibit the functioning of the transporter protein, are under clinical trials. However,

there are several other approaches to prevent the development of multidrug resistance. Since histone acetylation is implicated in the transcriptional regulation of MDR1 gene, alteration of activity of HDACs or HATs can contribute to the inhibition of PgP expression. HDAC inhibitors, as promising therapeutic agents against cancer are better characterized than HAT inhibitors. Despite the potential that epigenetically silent protooncogenes can be reactivated upon treatment with HDAC inhibitors, clinical trials of some compounds have been initiated.

Aims

In order to study the epigenetic regulation of MDR1 gene expression in the MCF7 breast carcinoma cell line and in its drug resistant derivative we aimed to answer the following questions.

1. Does drug resistance correlate with elevated MDR1 expression? Is the elevated level of MDR1 mRNA in the drug resistant cell line attributable to changed promoter activity or to other alterations (gene amplification, alteration in mRNA stability)?
2. If MDR1 promoter is actively transcribed in the drug resistant cells, does histone acetylation have a role in the maintenance of gene expression? It was previously described that MDR1 transcription leads to elevated levels histone acetylation in the promoter region, but acetylation of specific lysine residues in the chromatin of the control and transcribed region of the gene have not been investigated.
3. Can MDR1 expression be altered by modification of histone acetylation pattern using HDAC and HAT inhibitors? Can this treatment decrease the high MDR1 expression in the drug resistant cell line?
4. Do p300, GCN5 or PCAF histone acetyl transferases participate in the regulation of histone acetylation in the chromatin of MDR1 gene? In what HAT complexes may they exert their function?

Results and discussion

Both genetic and epigenetic alterations contribute to elevated expression of MDR1 in the MCF-KCR cell line, which has been developed by treatment of MCF7 with increasing doxorubicin concentration. The MDR1 gene copy number is increased by one order of magnitude in the drug resistant cell line. In addition to gene amplification, the MDR1 mRNA level is elevated in the MCF7-KCR cells compared to the parental cell line by four orders of magnitude. These data suggest that epigenetic changes contribute to the high activity of the MDR1 promoter. The stability of MDR1 mRNA in the drug resistant cells is not increased.

The MDR1 gene can be transcribed from two promoters. We found in the MCF7-KCR cells, that in contrast to the downstream promoter (DSP), the activity of the upstream promoter (USP), located 112 kb upstream of the former is unchanged. However, the expression level of the RPIB9/RUNDC3B, a gene with unknown function transcribed from the other strand partially overlapping USP, is increased in drug resistant cells compared to drug sensitive cells.

To study the epigenetic regulation of MDR1 expression, we examined histone acetylation in the chromatin of the gene using chromatin immunoprecipitation with antibodies specific to acetylated histone lysine residues H3K4, H3K9, H3K14, H4K8 and H4K12. Low level of histone acetylation at the region of USP and upstream first exon is correlated with the lack of upstream MDR1 mRNA. In contrast, the level of acetyl H3K9 is a hundred fold increased on the downstream promoter and the first exon of MDR1 in the MDR1 overexpressing cell line compared to the drug sensitive cell line. In the region of the transcription start site and first exon the acetylation level of H3K4 is slightly elevated in the case of active transcription. At the chromatin of the gene body H3K4 and H4K8 acetylation is mildly increased in the drug resistant MCF7-KCR. Our results confirm the recently described data reporting that not only the methylation of H3K4 lysine but its acetylation also correlates with transcriptional activity of a given gene.

Concomitantly with the elevated RPIB9 expression level in MCF7-KCR, we described a mild increase in the acetylation level of H3K9 at the gene promoter region. Accordingly, both of the actively transcribed promoters of MDR1 and RPIB9 in the drug resistant cells are characterized by elevated level of acetyl H3K9. It remains to be determined whether acetylation of H3K9, which can be catalyzed by GCN5/PCAF containing HAT complexes,

are required for gene activation or for maintenance of transcriptionally active chromatin structure.

We found that altered genome wide histone acetylation level may accompany the drug resistance, because the levels of all studied acetyl lysine histone residues are higher in the doxorubicin resistant cells than in the drug sensitive counterpart. Some other drug resistant cell lines in the literature are also characterized by elevated global histone acetylation but the reason for this is unknown.

While treatment with a histone deacetylase inhibitor, trichostatin A (TSA) caused an increase of global histone acetylation level in MCF7, it induced no further increase of that in MCF7-KCR. This data further suggests the altered regulation of histone acetylation during drug resistance development.

TSA sensitivity of MDR1 expression proves the important role of histone acetylation in the transcriptional regulation of MDR1. In drug sensitive cells MDR1 expression increased upon TSA treatment in contrast to MCF7-KCR cells, where it remained unchanged. One reason for the difference in the effect of TSA treatment on gene expression can be the genome-wide deregulated histone acetylation in MCF7-KCR cells. Other possibility is that it is caused by altered regulation of MDR1 gene specific histone acetylation. We found that induction of MDR1 expression in MCF7 cells was accompanied with increases in the levels of H3K4 and H3K9 acetylation in the region of the gene body and in the DSP and first exon, respectively. HDAC inhibition did not affect MDR1 mRNA level in MCF7-KCR cells, but at the same time acetylation of H4K12 increased in every studied region. These data suggest that acetylation of a specific lysine residue is not enough to additional activation of transcription.

To study the effect of lack of HATs on MDR1 expression, we used RNAi knockdown and HAT specific inhibitor were used. Treatment of the MCF7 cells with siRNAs specific to PCAF HAT and ADA2B, an essential subunit of the PCAF/GCN5 containing HAT complexes, resulted in the reduction of MDR1 mRNA level. Knockdown of GCN5, a HAT closely related to PCAF, did not have any effect on MDR1 expression. These data suggest that a HAT complex containing PCAF and ADA2B has a role in the regulation of basal

expression of MDR1. Furthermore, these data also indicate that, although PCAF and GCN5 are homologous, they have distinct functions. In contrast to drug sensitive cells, PCAF, ADA2B and GCN5 specific siRNA treatment resulted in no change in MCF7-KCR cells. However, simultaneous knockdown of PCAF and GCN5 resulted in a reduction of MDR1 mRNA level in the drug resistant cells. This finding suggests that these HATs substitute each other in maintaining the elevated expression of MDR1.

In order to study the role of p300 in the regulation of histone acetylation and MDR1 gene expression, its function was inhibited by a novel compound, HATi II. The recently described inhibitor was shown in vitro to inactivate p300 to a higher, GNC5 to a lower extent at 5 μ M concentration. In both studied cell lines HATi II treatment resulted in the reduction of genome-wide acetylation on H3K9, H3K14, H3K18 and H4K12 lysine residues. Upon treatment of MCF7 cells with 20 μ M HATi II, MDR1 mRNA level slightly decreased, which may indicate the regulatory role of p300 in MDR1 expression in the drug sensitive cells. HATi II treatment caused lower RPIB9 mRNA level as well. Despite the reduced genome- wide histone acetylation, levels of acetyl lysine residues in the chromatin region of the studied genes were not affected by the decrease of gene expression caused by HATi II treatment. The compound may inhibit the acetylation of other lysine residues than the studied ones or it is possible that the acetylation of some transcriptionally regulatory non-histone proteins is affected.

Interestingly, HATi treatment caused a further increase in the expression of MDR1. Fluorescent drug efflux assay showed lower intracellular doxorubicin accumulation in the HATi treated MCF7-KCR cells than in the untreated cells. PgP expression was accompanied with elevated acetylation level of H3K4 at MDR1 specific regions. One possible explanation for the unexpected induction of MDR1 gene could be that HATi II is sensed by the cell as a xenobiotic thereby it activates several signaling pathways. Another hypothesis is that inhibition of p300 may result in the activation of a/some HAT(s) and this acetylates H3K4 lysine residue. However, it is questionable whether increased MDR1 mRNA level is due to elevated level of acetyl H3K4. Since p300 participate in the regulation of several non-histone proteins as well, it is possible, that alteration in the

acetylation state of another factor that regulates MDR1 expression causes the higher mRNA level.

Our results suggest that the generation and maintenance of histone acetylation is differently regulated in the drug sensitive and resistant cells. High level of histone acetylation can be the consequence of increased HAT activity, but our experiments did not confirm this possibility in the case of PCAF, GCN5 and p300. Increased acetyl lysine level can also be caused by the reduced activity or the lack of HDACs. We observed an increased expression level of HDAC5 and a reduced mRNA level of SIRT7, and presumably other regulatory mechanisms of HDACs may also be changed in the MCF7-KCR cells compared to MCF7 cells.

Summary

Our results indicate that the drug resistant MCF7-KCR cell line uses multiple mechanisms that ensure elevated MDR1 expression. These mechanisms include gene amplifications and epigenetic alterations. Gene expression is associated with highly increased acetylation level of H3K9 lysine residue around the transcriptional start site in the drug resistant cells. Gene induction in the drug sensitive cells is also accompanied with acetylation of H3K9 in the promoter region. p300 and PCAF regulate MDR1 basal transcriptional activity in drug sensitive cells. In the drug resistant cells PCAF and GCN5 substitute each other in maintaining the elevated expression of MDR1 and they may be responsible for generating the elevated H3K9 acetylation pattern at the MDR1 TSS. Generally, histone acetylation level is positively correlated with transcriptional activity. Our results demonstrate that active gene expression correlates with the increased acetylation level of only specific lysine residues. However, acetylation of specific lysines not certainly results in additional gene activity. Importantly, despite a change of gene expression histone acetylation level in the gene chromatin can be unaltered.

Our data suggest that repeated exposure to chemotherapy may result in deregulated histone acetylation. Our findings are valuable for the understanding of the role of histone modifications in cancer.